

**New transgenic plant expressing mistletoe lectin - useful for producing recombinant lectin in e.g. cancer diagnosis and therapy**

**Patent Assignee: MADAUS KOELN AG**

**Inventors: BAUR A; ECK J; LENTZEN H; ZINKE H**

#### Patent Family

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
EP 884388	A1	19981216	EP 95109949	A	19950626	199903	B
			EP 98105660	A	19950626		

**Priority Applications (Number Kind Date):** EP 95109949 A ( 19950626); EP 98105660 A ( 19950626)

#### Patent Details

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
EP 884388	A1	G	31	C12N-015/29	Div ex application EP 95109949
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE					Div ex patent EP 751221

#### Abstract:

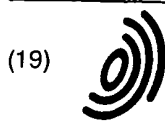
EP 884388 A

A transgenic plant transformed with a vector containing at least part of a defined DNA sequence of 1923 base pairs given in the specification encoding a mistletoe (*Viscum album*) lectin prepro protein or a biologically active fragment of it is new. Also claimed are: (i) a polypeptide produced by a plant as above, where the polypeptide exhibits at least one enzymatic modification other than the glycosylation that occurs in *Viscum album* or the polypeptide is a fusion protein; (ii) a mistletoe lectin polypeptide dimer in which at least one of the monomers is a polypeptide as in (i); (iii) an immunotoxin comprising the polypeptide of (i) or the polypeptide dimer of (ii).

**USE** - The plants are used for large-scale production of mistletoe lectin for diagnostic or therapeutic purposes (e.g. in cancer therapy).

Dwg.0/11





Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) **EP 0 884 388 A1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
16.12.1998 Patentblatt 1998/51

(21) Anmeldenummer: 98105660.9

(22) Anmeldetag: 26.06.1995

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C12N 15/29**, C07K 14/42,  
C12N 15/62, A61K 38/16,  
A61K 35/78, A61K 47/48,  
C07K 19/00, C12Q 1/68  
// A61K45/05

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GRIE IT LI LU MC NL  
PT SE**

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en)  
nach Art. 76 EPÜ:  
95109949.8 / 0 751 221

(71) Anmelder: **MADAUS AG Köln**  
51109 Köln (DE)

(72) Erfinder:  
• **Lentzen, Hans, Dr.**  
51503 Rösrath (DE)

• **Eck, Jürgen, Dr.**  
64646 Heppenheim (DE)  
• **Baur, Axel, Dr.**  
40668 Meerbusch-Ossum (DE)  
• **Zinke, Holger, Dr.**  
64404 Bickenbach (DE)

(74) Vertreter: **VOSSIUS & PARTNER**  
Siebertstrasse 4  
81675 München (DE)

Bemerkungen:

Diese Anmeldung ist am 27 - 03 - 1998 als  
Teilanmeldung zu der unter INID-Kode 62  
erwähnten Anmeldung eingereicht worden.

(54) **Transgene Pflanzen enthaltend rekombinantes Mistellektin (rML)**

(57) Die Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle,  
die Präproproteine codieren, die nach Reifung die biolo-  
gische Aktivität des Mistellektindimers aufweisen, Vek-  
toren, die diese Nukleinsäuremoleküle enthalten, mit  
diesen Vektoren transformierte Wirte und Polypeptide  
bzw. Polypeptiddimere, die von diesen Nukleinsäure-  
molekülen codiert werden. Die erfindungsgemäßen  
Polypeptide bzw. Polypeptiddimere sind therapeutisch  
vielseitig anwendbar. Somit betrifft die Erfindung ferner  
Immuntoxine sowie Arzneimittel, die die erfindungs-  
gemäßen Polypeptide bzw. Polypeptiddimere enthalten.  
Schließlich betrifft die Erfindung diagnostische Zusam-  
mensetzungen, die die erfindungsgemäßen Nuklein-  
säuremoleküle, die erfindungsgemäßen Polypeptide  
bzw. Polypeptiddimere und/oder Primer, die spezifisch  
an die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle  
hybridisieren, enthalten.

EP 0 884 388 A1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die Präproteine codieren, die nach Reifung die biologische Aktivität des Mistellektindimers aufweisen, Vektoren, die diese Nukleinsäuremoleküle enthalten, mit diesen Vektoren transformierte Wirte und Polypeptide bzw. Polypeptiddimere, die von diesen Nukleinsäuremolekülen codiert werden. Die erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. Polypeptiddimere sind therapeutisch vielseitig anwendbar. Somit betrifft die Erfindung ferner Immuntoxine sowie Arzneimittel, die die erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. Polypeptiddimere enthalten. Schließlich betrifft die Erfindung diagnostische Zusammensetzungen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, die die erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. Polypeptiddimere und/oder Primer, die spezifisch an die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle hybridisieren, enthalten.

Mistelextrakte werden seit Jahrhunderten therapeutisch genutzt. Seit Anfang dieses Jahrhunderts werden Mistelpräparate zur Krebsterapie mit unterschiedlichem Erfolg angewandt [Bocci, 1993; Gabius et al., 1993; Gabius & Gabius, 1994; Ganguly & Das, 1994]. Hajto et al. [1989, 1990] konnte zeigen, daß die therapeutischen Effekte insbesondere durch sogenannte Mistellektine (*Viscum album* Agglutinine, VAA) vermittelt werden. Es wird neben einer cytotoxischen Wirkung heute insbesondere eine (unspezifische) Immunstimulation diskutiert, deren positive Effekte zur begleitenden Therapie und zur Nachsorge von Tumorpatienten ausgenutzt werden. Eine Steigerung der Lebensqualität bei solchen Patienten wird möglicherweise durch die Ausschüttung körpereigener Endorphine vermittelt [Heiny und Beuth, 1994].

Zahlreiche Untersuchungen *in vitro* [Hajto et al., 1990; Männel et al., 1991; Beuth et al., 1993] und *in vivo* [Hajto, 1986; Hajto et al., 1989, Beuth et al., 1991; Beuth et al., 1992], sowie klinische Studien [Beuth et al., 1992] belegen die erhöhte Freisetzung von inflammatorischen Cytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) sowie eine Aktivierung von zellulären Komponenten des Immunsystems (T<sub>H</sub>-Zellen, NK-Zellen).

Als aktives Prinzip der Mistelextrakte wird heute ein 60kDa Mistellektin-Protein angesehen, das auf biochemischen Weg aus Extrakten gewonnen werden kann [Franz et al., 1977; Gabius et al., 1992]. Das ML-Protein besteht aus zwei kovalent S-S verbrückten Untereinheiten, dessen A-Kette für eine enzymatische Inaktivierung von Ribosomen [Endo et al., 1988] und dessen B-Kette für die Carbohydratbindung verantwortlich ist. Die biologische Aktivität wird hauptsächlich auf die Lektinaktivität der B-Kette zurückgeführt [Hajto et al., 1990].

Das Wissen um Struktur-Wirkungsbeziehungen des Mistellektins (ML) ist jedoch bis heute gering. So ist der Beitrag der einzelnen Ketten und deren unterschiedliche biochemische und enzymatische Aktivitäten

zur beobachteten Wirkung bzw. den therapeutischen Effekten unklar. Erschwert wird die Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen durch Kontamination der Präparationen mit anderen Pflanzeninhaltsstoffen der Mistel [Stein & Berg, 1994]. Es wird eine Abhängigkeit der Aktivität von Extraktpräparaten von unterschiedlichen Zusammensetzungen der Extrakte, wiederum abhängig von der Art des Wirtsbaums (z.B. Apfel, Kiefer, Pappel) diskutiert [Hülse et al., 1986]. Sowohl für Viscotoxine [Garcia-Olmedo et al., 1983; Mendez et al., 1990] als auch für die weiteren Viscumine (z. B. ML-2, ML-3) werden ähnliche Wirkungen postuliert [Eifler et al., 1994]. Selbst auf biochemischen Weg (Affinitätschromatographie) hochrein aufbereitete ML Präparationen weisen eine bedeutende Heterogenität (Fig. 8) auf. Diese Heterogenität bezieht sich auf die biochemisch meßbaren Aktivitäten der Ketten, auf die hervorgerufenen *in vitro* und *in vivo* Effekte, wie auch auf die Proteinstrukturen selbst. Strukturvarianten werden für Glycosylierungen der ML A- und B-Kette sowie für Sequenzvariationen diskutiert. Gabius et al. [1992] und Dietrich et al. [1992] zeigen eine Sequenzvariabilität der A1 und A2-Ketten des ML-1.

Um die therapeutischen Wirkungen des Mistellektins genauer untersuchen zu können, ist dessen Reindarstellung als strukturell homogene Substanz wünschenswert. Ferner ist für die Fachwelt von Interesse, Mistellektin oder seine Bestandteile in großen Mengen in reiner Form herstellen zu können, um es/sie beispielsweise großtechnisch als wirksamen Bestandteil von Arzneimitteln einsetzen zu können. Diese Ziele konnten bisher durch die im Stand der Technik bekannten Verfahren nicht annähernd realisiert werden. Bei Isolierungen aus pflanzlichem Material wird nach dem derzeitigen Stand der Technik immer ein heterogenes Substanzgemisch erhalten.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war somit, Mistellektin in reiner Form und in Mengen zur Verfügung zu stellen, die eine großtechnische Verwertung erlauben. Die Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die Erfindung ein Nukleinsäuremolekül, das (a) ein Präprotein codiert, das nach Reifung die biologische Funktion des Mistellektindimers aufweist und die in Fig. 4c dargestellte Nukleotidsequenz aufweist; (b) ein Fragment des Präproteins gemäß (a) codiert, wobei das Fragment natürlicherweise ein vorzugsweise biologisch aktiver Bestandteil des Mistellektindimers ist; (c) sich durch die Degeneration des genetischen Codes vom Nukleinsäuremolekül gemäß (a) oder (b) unterscheidet; oder (d) unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekül gemäß (a), (b) oder (c) hybridisiert und ein Polypeptid mit der in (a) oder (b) angegebenen biologischen Funktion codiert.

In der Darstellung von Gensequenzen des Mistellektins können erstmals ausgehend von dieser Sequenz rekombinante, hochreine Einzelketten (rMLA, rMLB) erhalten werden, die *in vitro* reassoziert werden

können und so ein rML-Holoprotein ergeben, das proteochemisch, enzymatisch und strukturell homogen ist. Das reassozierte rekombinante Protein weist keine Variabilität und Mikroheterogenität, insbesondere hinsichtlich der Primärstruktur und der posttranslationalen Modifikationen (Glycosylierungen, Phosphorylierungen) auf und ist sowohl als Holoprotein, als Teilkette und in Form von Subfragmenten für therapeutische Zwecke besonders geeignet.

Unter einem "Fragment" eines Mistellektinpräproteins wird erfindungsgemäß jedes Fragment, also nicht nur ein natürlicherweise vorkommendes Fragment verstanden, das ein vorzugsweise biologisch aktiver Bestandteil des Mistellektindimers ist.

Der Begriff "natürlicherweise" in Verbindung mit "Bestandteil des Mistellektins" bedeutet erfindungsgemäß, daß das so gekennzeichnete Fragment entweder eine Kette des Mistellektindimers darstellt oder ein Subfragment der Kette ist, das natürlicherweise in der Kette vorkommt. Diese Fragmente sind vorzugsweise biologisch aktiv.

Unter "biologisch aktiv" wird erfindungsgemäß verstanden, daß diese Fragmente mindestens eine biologische Funktion der Ketten oder des Dimers wie in dieser Anmeldung beschrieben oder eine sonstige biologische Funktion der einzelnen Ketten oder des Dimers aufweisen. Außerdem wird unter "biologisch aktiv" auch eine pharmakologische Aktivität verstanden.

Mit Hilfe rekombinanter ML-Proteine ist zusätzlich die Untersuchung der Beiträge der einzelnen Domänen und Subdomänen experimentell erstmals möglich. Rekombinante ML-Proteine und rekombinante Untereinheiten/Teilketten sind die Grundlage entsprechender definierter Monosubstanzpräparate als Ersatz von Extraktpräparaten und standardisierten Extrakten.

Die Klonierung des Mistellektin kodierenden Gens konnte auf der Basis einer neuen Klonierungsstrategie überraschenderweise bewerkstelligt werden, nachdem konventionelle Klonierungsstrategien versagt hatten:

Vom Mistellektin ML-1 sind eine Reihe von proteochemischen Daten bekannt. Es sind dies neben Molekulargewicht und Untereinheitenstruktur insbesondere kurze N-terminale Peptide, deren Aminosäuresequenzen unabhängig von Dietrich et al. [1992] und Gabius et al. [1992] [siehe auch DE4221836] beschrieben worden sind. Es ist unmöglich, ausgehend von den N-terminalen Peptiden der A- bzw. B-Kette aufgrund von deren Aminosäurezusammensetzungen und dem damit verbundenen hohen Degenerationsgrad der ableitbaren Nukleinsäuresequenzen synthetische Oligonukleotide herzustellen, deren Degenerationsgrad ausreichend niedrig ist, um beim Screening von genomischen Genbibliotheken zur Identifikation von ML-Genfragmenten zu kommen. Dies gilt ebenfalls für cDNA-Genbanken, die ausgehend von *Viscum album* poly-(A+) RNA dargestellt wurden.

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die Amplifikation von DNA-Abschnitten, die zwischen bekannten

Abschnitten liegen [Erich et al., 1988]. Mit einem "sense"-Oligonukleotid ausgehend von N-Terminus von MLA und einem "antisense" Oligonukleotid N-terminal von MLB wäre eine Amplifikation des dazwischenliegenden Genabschnitts unter der Voraussetzung der Intronfreiheit des ML-Gens denkbar (Fig. 1a). In der Praxis zeigt eine Analyse der N-terminalen Sequenz der B-Kette, daß der Degenerationsgrad der denkbaren Kombinationen von Oligonukleotiden für eine erfolgreiche Durchführung dieses Ansatzes jedoch viel zu hoch ist. Dies begründet sich insbesondere aus der für eine Oligonukleotidkonstruktion ungünstigen Sequenz des B-Ketten N-Terminus, wodurch eine Amplifikation von ML-Gensequenzen ausgehend von den bekannten Aminosäuresequenzbereichen nicht praktikabel ist (Fig. 1b).

Zur Klonierung des ML-Gens mit Hilfe einer veränderten PCR-Strategie wurde daher versucht, zur Konstruktion von Amplifikationsoligonukleotiden weitere Proteindaten, insbesondere auf der Basis von Verwandtschaftsbeziehungen des Mistellektins zur Klasse der Typ I und Typ II Ribosomen-inaktivierender Proteine (RIPs) [Stirpe et al., 1992] einfließen zu lassen. Basierend auf multiplen Alignments von (a) Typ I RIP-Proteinen und Ricin-A-Ketten sowie (b) den B-Ketten von Abrin und Ricin wurden an insgesamt 8 Sequenzbereichen konservierte Regionen identifiziert. Ausgehend von diesen Sequenzregionen und unter Einbeziehung von Codonnutzungstabellen verwandter Spezies wurden insgesamt 21 Oligonukleotide konstruiert und in verschiedenen Kombinationen zu mehr als 200 Amplifikationsexperimenten eingesetzt. In keinem Fall konnten jedoch spezifische Amplifikationsprodukte erhalten werden, obwohl die PCR-Bedingungen, was Annealing-Temperatur,  $Mg^{2+}$ -Gehalt sowie Zyklusparameter betrifft, in weiten Grenzen variiert wurde.

Sowohl Screening von genomischen und cDNA-Banken als auch die Anwendung von PCR-Techniken erlaubten es somit nicht, aufgrund der angeführten Überlegungen zu spezifischen ML-DNA-Sequenzen zu gelangen.

Es wurde daher nach neuen Wegen gesucht, weitere strukturelle Eigenschaften der Ricin- und Abrin-Struktur in die Konstruktion der Amplifikationsoligonukleotide einfließen zu lassen.

Da der enzymatische Mechanismus von Ribosomen inaktivierenden Proteinen (RIPs), hier insbesondere dem TypII-RIP Ricin, dem des ML gleicht [Endo et al., 1988a + 1988b], war nicht auszuschließen, daß auch strukturelle Übereinstimmungen auf der Ebene der funktionellen Primär- und Tertiärstrukturbereiche vorhanden sind. Ausgehend von der Kristallstruktur von Ricin [Katzin et al., 1991; Rutenber & Robertus, 1991; Weston et al., 1994] ergab eine Analyse der Kettenflexibilitäten in der Ricin-A Kette einen Hinweis auf die geringe Mobilität des Arg180, das innerhalb eines konservierten Sequenzbereiches liegt. Weiterhin wurde eine Analyse der aufgrund der sterischen Anordnung

des Kettenrückgrats gegebenen möglichen Aminosäuresubstitutionen in diesem Bereich des aktiven Zentrums unter Berücksichtigung der Substratwechselwirkungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Überlegungen wurden nun mit einer Auswertung von umfassenden Sequenzalignments der Ricin-A-Kette und weiteren Typl RIPs in Bezug gebracht.

Mit der Erweiterung der Ergebnisse der Sequenzvergleiche durch die Einbeziehung struktureller Daten ergaben sich so Wahrscheinlichkeitsdaten für das Auftreten bestimmter Aminosäurereste an bestimmten Positionen. Dadurch wurde es möglich, eine Reihe von theoretischen ML-Aminosäuresequenzen für diesen Bereich zu postulieren und anhand dieser ein entsprechendes außergewöhnlich gering degeneriertes Oligonukleotid (RMLA2) zu konstruieren (Fig. 1c).

Es konnten nun mit der Kombination RMLA1 (ein degeneriertes Oligonukleotid, das aus der N-terminalen Aminosäuresequenz der MLA-Kette abgeleitet wurde; vgl. Fig. 1c) und dem durch obige Überlegungen konstruierten "active-site" Oligonukleotid RMLA2 bei definierten PCR-Parametern ausgehend von komplexer genomischer ML-DNA Fragmente erhalten werden, nachdem alle diesbezüglichen alternativen Ansätze wie oben beschrieben ohne Ergebnis blieben.

Die Vervollständigung der Sequenzinformation des Gens wurde nun über spezifische nichtdegenerierte Oligonukleotidprimer, abgeleitet aus der mit Klonierung und Sequenzierung des Fragments a (Fig. 3) vorhandenen Genteilsequenz des MLA, und degenerierten Oligonukleotiden, abgeleitet aus RIP 1 und Ricin/Abrin Sequenzalignments, mit Hilfe von weiteren PCR-Amplifikationen durchgeführt. Zur Konstruktion der degenerierten B-Ketten-Oligonukleotide wurden Sequenzalignments der B-Ketten der Ricine und Abrine herangezogen, wo ebenfalls einige Bereiche hoher Konservierung gefunden wurden.

Zur Darstellung der 5'- und 3'-Enden des Holoпротеins, B-Ketten-Teilfragmente sowie der 5'- und 3'- nichttranslatierten Abschnitte wurde ausgehend von isolierter Mistel-RNA analoge cDNA durch reverse Transkription synthetisiert und mit Hilfe der RACE-Technik [Frohman et al., 1988] die entsprechenden Genabschnitte dargestellt. Nachdem eine Vielzahl sich jeweils überlappenden Genfragmente vorhanden war (Fig. 3), wurden anschließend vollständige A-Ketten- und B-Ketten-Genabschnitte, jeweils ausgehend von komplexer genomischer Mistel-DNA wiederum durch spezifische PCR dargestellt. Die Gensequenzen von rMLA und rMLB, versehen mit terminalen Modifikationen, sind in Fig. 4a und Fig. 4b dargestellt. Die auch 5'- und 3'- nichttranslatierte Bereiche sowie Endopeptid- und Signalpeptid-codierende Genabschnitte umfassende vollständige ML-Gensequenz ist in Fig. 4c dargestellt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls ist das Fragment die A-Kette des Mistellektins, die durch die in Fig. 4a (MLA) dargestellte Nukleotidsequenz kodiert

wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls ist das Fragment die B-Kette des Mistellektins, die durch die in Fig. 4b (MLB) dargestellte Nukleotidsequenz kodiert wird.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül, das ein DNA-Molekül ist.

Erfindungsgemäß wird unter "DNA-Molekül" sowohl ein genomisches, wie auch ein cDNA-Molekül oder ein (semi)synthetisches DNA-Molekül verstanden. Verfahren zur Herstellung dieser verschiedenen DNA-Moleküle sind dem Fachmann in Kenntnis der erfindungsgemäßen Lehre bekannt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nukleinsäuremolekül ein RNA-Molekül.

Die Erfindung betrifft ferner einen Vektor, der mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül enthält.

Der erfindungsgemäße Vektor kann beispielsweise ein einziges erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül enthalten, das das gesamte Mistellektin-Präproprotein kodiert. Sofern dieser Vektor ein Expressionsvektor ist, kann das Präproprotein in einem geeigneten transformierten Wirt prozessiert werden und die monomeren Einheiten zum Mistellektindimer *in vivo* oder *in vitro* zusammengefügt werden. In einer anderen Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Vektor ein Vektor, der lediglich zur Propagation der erfindungsgemäßen Nukleinsäure eingesetzt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der erfindungsgemäße Vektor sowohl ein Nukleinsäuremolekül, das die A-Kette des Mistellektins oder ein Fragment davon kodiert, als auch ein Nukleinsäuremolekül, das die B-Kette oder ein Fragment davon kodiert. Vorzugsweise sind die Fragmente der Monomere biologisch aktiv.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Vektor ein Expressionsvektor. Dem Fachmann ist klar, wie er geeignete Expressionsvektoren für verschiedene Wirtsorganismen bereitstellt.

Erfindungsgemäß wurde zur heterologen Expression eine für die Mistellektin A-Kette codierende Sequenz durch spezifische PCR ausgehend von komplexer genomischer Mistel-DNA dargestellt. Über nichtkomplementäre Bereiche der eingesetzten Primer-Oligonukleotide wurden hierbei Translations-Kontrollelemente sowie Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen angefügt, wodurch ausgehend von dem genomisch vorliegenden Präpromistellektin-Gen die Klonierung und getrennte Expression der Mistellektin A-Kette ermöglicht wurde.

Der 5'-Bereich der für rMLA codierenden Sequenz entsprechend der Aminosäurereste Tyrosin<sup>1</sup> - Tyrosin<sup>17</sup> [Dietrich et al., 1992; Gabius et al., 1992] wurde unter Vorschaltung eines Translations-Startcodons als syn-

thetisches Genfragment durch Hybridisierung und Klonierung zweier Oligonukleotide dargestellt. Hierdurch wurde eine Optimierung der Gensequenz hinsichtlich der Codon-Auswahl, wie sie für stark exprimierte Gene in *Escherichia coli* beschrieben ist [Gribskov et al., 1984], erzielt. Am 3'-Ende des synthetischen rMLA-Genfragments sowie am 5'-Ende des mittels PCR dargestellten rMLA-Genfragments wurde durch den gezielten Austausch des Tyrosin<sup>17</sup>-Codons von TAC zu TAT eine *Ssp* I - Restriktionsschnittstelle eingeführt, die eine Fusion der beiden rMLA-Genfragmente unter Darstellung des Vektors pML14-17 (Fig. 5) ermöglichte. Die für rMLA codierende Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt (Fig. 4a). Zur Expression von rMLA in *Escherichia coli* wurde die Gensequenz aus dem Vektor pML14-17 isoliert und durch Insertion in den Expressionsvektor pT7-7 [Studier & Moffart, 1986] unter die Kontrolle des T7-RNA Polymerase Promotors sowie eines Transkriptionsterminators gestellt. Mit dem resultierenden Expressionsvektor pT7-MLA (Fig. 5) wurde der *E. coli* Expressionsstamm BL21 transformiert. Die Induktion der Genexpression ist durch das Auftreten einer Proteinbande entsprechend der nichtglykosylierten, rekombinanten Mistellektin A-Kette gekennzeichnet, die eine relative Molekülmasse von 25 kDa besitzt. Nachweis und Identifizierung des rekombinanten Expressionsproduktes erfolgte durch Western-Blot Analyse unter Verwendung eines spezifischen anti-MLA-Antikörpers (Fig. 7).

Zur heterologen Expression der Mistellektin B-Kette wurde die vollständige, MLB codierende Sequenz durch spezifische PCR aus komplexer genomischer *Viscum album* DNA amplifiziert, wobei über nicht-komplementäre Bereiche der eingesetzten Primer-Oligonukleotide Translationskontrollelemente sowie Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen eingeführt wurden (Fig. 6). Das resultierende 0,8 kbp PCR-Produkt wurde nach Klonierung im TA-Klonierungsvektor pCR11 durch Insertion in den Expressionsvektor pT7-7 unter die Kontrolle von Transkriptionskontrollelementen gestellt und mit dem resultierenden Expressionsvektor pT7-MLB der Expressionsstamm *E. coli* BL21 transformiert.

Die Integrität der rMLB-codierenden Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt (Fig. 4b). Der Nachweis der Expression erfolgte durch Western-Blot Analyse unter Verwendung eines spezifischen anti-MLB-Antikörpers (TB33), wobei 2h nach Induktion der Genexpression ein immunreaktives Protein mit einer relativen Molekülmasse von 31 kDa entsprechend der nicht-glykosylierten, rekombinanten Mistellektin B-Kette auftritt (Fig. 7b). Eine Analyse der Zellfraktionen nach Gesamtzellaufschluß der *E. coli* Zellen zeigte eine Aufteilung der synthetisierten rMLB-Kette in einen löslichen Anteil im Überstand sowie einen unlöslichen "inclusion bodies"-Anteil im Sediment des *E. coli* Zellaufschlusses, wobei 4 h nach Induktion der lösliche bzw. unlösliche Anteil jeweils 50 % der Gesamtausbeute betrug (Fig.

7b).

Ferner betrifft die Erfindung einen Wirt, der mit mindestens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist.

Je nach Zielsetzung des Fachmannes kann mit dem erfindungsgemäßen Wirt lediglich eines der beiden Monomere oder die Kombination beider Monomere, vorzugsweise als assoziiertes Dimer hergestellt werden. Der erfindungsgemäße Wirt kann eine eukaryontische oder prokaryontische Zelle, eine transgene Pflanze oder ein transgenes Tier sein.

Vorzugsweise ist der erfindungsgemäße Wirt eine Säugerzelle, eine Pflanzenzelle, ein Bakterium, eine Pilzzelle, eine Hefezelle, eine Insektenzelle oder eine transgene Pflanze.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Wirt das Bakterium *E. coli*, eine *Aspergillus*-Zelle oder eine *Spodoptera*-Zelle, vorzugsweise eine *Spodoptera frugiperda*-Zelle.

Die Erfindung betrifft ferner ein Polypeptid, das von dem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül oder dem erfindungsgemäßen Vektor kodiert wird und/oder vom erfindungsgemäßen Wirt produziert wird.

Das erfindungsgemäße Polypeptid weist vorzugsweise die biologische Aktivität der A-Kette oder der B-Kette des Mistellektins auf. In anderen Ausführungsformen kann das erfindungsgemäße Polypeptid jedoch auch nur einen Teil der biologischen Aktivität oder gar keine biologische Aktivität mehr aufweisen. Unter "Teil der biologischen Aktivität" wird erfindungsgemäß entweder eine verminderte Aktivität und/oder eine Anzahl von Aktivitäten aus dem biologischen Aktivitätsspektrum verstanden. Das erfindungsgemäße Polypeptid kann auch ein Fragment der A- oder B-Kette sein, das eine der vorgenannten Eigenschaften aufweist.

## Untersuchung der Eigenschaften von rMLA und rMLB

### (I) Relative Molekülmassen und Struktur

Die relativen Molekülmassen wurden durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen und der anschließenden Proteinfärbung mittels Silber bzw. Coomassie-Brilliant-Blue bzw. durch immunologische Färbung im Rahmen einer Western-Blot Analyse bestimmt.

Überraschenderweise wurde hierbei gefunden, daß die rekombinante, nicht-glykosylierte Mistellektin A-Kette eine relative Molekülmasse von 25 kDa zeigt und sich damit signifikant von den natürlichen Mistellektin A-Ketten A<sub>1</sub> mit 31 kDa bzw. A<sub>2</sub> mit 29 kDa unterscheidet. Dieser Unterschied im relativen Molekulargewicht ist vor allem deshalb überraschend, weil im Stand der Technik davon ausgegangen wurde, daß die A-Kette nicht glykolisiert ist. Die rekombinante Mistellektin B-Kette weist eine relative Molekülmasse von 31 kDa auf und ist damit wesentlich leichter als die glykosylierte,

natürliche Mistellektin B-Kette mit 36 kDa. (Fig. 7).

Die bei natürlichen ML-Proteinen auftretende Heterogenität aufgrund Glykosylierung und/oder Sequenzvariationen, die sich im SDS-Gel als breite Bande zeigt, tritt im Falle der rekombinanten Spezies in keinem Fall auf.

Die relativen Molekülmassen des reassozierten rMLA /rMLB Holoproteins addieren sich zu 56 kDa im Vergleich zu dem schwereren natürlichen ML (nML) mit 65 - 67 kDa.

## (II) Isoelektrische Homogenität

rMLA erweist sich als isoelektrisch homogenes Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 6,8 im Gegensatz zu hochreinen natürlichen Mistellektin A-Ketten, die sich auf 4 Species mit isoelektrischen Punkten von 5,2; 5,4; 5,7 und 6,2 aufteilen. (Fig. 8).

rMLB erweist sich als isoelektrisch homogenes Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 5,1 im Gegensatz zu natürlicher Mistellektin B-Kette, die sich auf mindestens 2 Species mit isoelektrischen Punkten von 7,1 und 7,3 aufteilt. (Fig. 8).

Es ergeben sich damit für das natürliche ML-Holoprotein eine Vielzahl von Molekülvarianten und -kombinationen (Fig. 8 unten), während sich für rMLA, B Proteine eine einheitliche Mobilität in der IEF Chromatofocussierung ergibt, was die Homogenität des rML gegenüber der Mikroheterogenität der natürlichen Proteinspezies dokumentiert.

## (III) Enzymatische Aktivität von rMLA

Durch Einsatz immunaffinitätsgereinigter rMLA Präparationen in einem gekoppelten Transkriptions-/Translationsassay wurde translationsinhibierende Aktivität für rMLA (isoliert aus dem löslichen Expressionsproduktanteil) und rMLA (isoliert aus unlöslichem "inclusion-bodies"-Anteil) nachgewiesen.

rMLA zeigt im Vergleich zu natürlicher Mistellektin A-Kette eine unterschiedliche Hemmcharakteristik in Bezug auf die Dosisabhängigkeit der Translationsinhibition sowie in Bezug auf die nicht-inhibierbare Translations-Restaktivität im verwendeten Retikulozyten-Lysat. (Fig. 9). Die enzymatische Eigenschaft, die die Grundlage für die toxische Wirkung ML-Holoproteinen darstellt, ist in rekombinanten Spezies signifikant reduziert.

## (IV) Carbohydrat-bindende Aktivität von rMLB

rMLB-Ketten, sowohl aus der löslichen wie auch aus der renaturierten/reoxidierten löslichen Expressionsfraktion sowie reassozierte rMLA/rMLB, rMLA/MLB und MLA/rMLB Holoproteine können an eine Lactosylsepharosesäule (Säulenpuffer 20 mM Phosphat-Puffer, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,2) gebunden und spezifisch mit Lactose (0,3 M Lactose in Säulenpuffer) eluiert werden. Die Carbohydratbindeaktivität der

rekombinanten Proteine kann so zur Affinitätsreinigung herangezogen werden.

Eine Quantifizierung der Carbohydratbindung durch rekombinante rMLB-Proteine kann durch Messung im ELLA-System unter kompetitiven Bedingungen mit Galactose oder Lactose erfolgen. Der kompetitive ELLA-Test zeigt Unterschiede in der Bindecharakteristik, ausgedrückt durch die systemspezifischen  $IC_{50}$ -Werte für die halbmaximale Verdrängung der Proteine vom immobilisierten Asialofetuin als Ligand durch Galactose ( $IC_{50}$  nML: 1,65 mM,  $IC_{50}$  rMLB: 1,3 mM) (Fig. 10).

In einer bevorzugten Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Polypeptid mindestens eine chemische oder enzymatische Modifizierung auf.

Diese Modifizierung kann die gegebenenfalls vorhandene biologische Aktivität des Polypeptids verändern, erniedrigen oder erhöhen. Eine derartige Modifizierung kann z.B. nach der Transiation und Isolierung des Polypeptids erfolgen. Andererseits können derartige Modifizierungen bei der chemischen oder semisynthetischen Herstellung des erfindungsgemäßen Polypeptids eingefügt werden. Diese Modifikationen können vom Fachmann nach an sich bekannten Verfahren eingefügt werden, um die pharmakologische Aktivität des Mistellektins zu verändern, vorzugsweise zu verbessern.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Polypeptid ein Fusionsprotein. Das Fusionsprotein weist vorzugsweise die vorstehend definierte biologische Aktivität auf.

Auch diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Polypeptids ist vorzugsweise darauf ausgerichtet, die pharmakologischen Eigenschaften der Mistellektin-Polypeptide für weitere Targets auf zellulärer Ebene zu verändern und vorzugsweise zu verbessern.

Die Erfindung betrifft ferner ein Polypeptiddimer mit den biologischen Aktivitäten des Mistellektins, wobei die beiden Monomere von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen codiert werden.

Unter "biologische Aktivität des Mistellektins" wird jede biologische Aktivität aus dem Spektrum der gesamten biologischen Aktivitäten des Mistellektins verstanden. Eine derartige Funktion ist z.B. die pharmakologische Wirkung des Mistellektins.

In zahlreichen humanen und murinen Tumorzelllinien induzierte pflanzliches Mistellektin-1 den Zelltod durch apoptotische Mechanismen (Janssen, 1993). Mistellektin-1 bzw. die B-Kette alleine induzierten die Freisetzung von Cytokinen aus peripheren mononukleären Zellen gesunder, humaner Blutspender (Hajto, 1990). Aus neutrophilen Granulocyten von Krebspatienten induzierte Mistellektin-1 die Sekretion von Superoxidanionen (Timoshenko, 1993). Mistellektin-1 induzierte die Expression der  $\alpha$ -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) bzw. des HLA-DQ-Antigens auf peripheren Lymphozyten gesunder, humaner Blutspender



(Beuth, 1992). Nach Applikation von Mistellektin-1 in Mäuse wurde eine Zunahme der Thymuszellzahl, der Anzahl der zytotoxischen T-Lymphozyten (Lyt-2+) und der Helfer-T-Zellen (L3T4+) im Thymus und die Zahl der Peritonealmakrophagen, auch speziell derjenigen, die den Aktivierungsmarker MAC-3 trugen, gemessen (Beuth, 1994). Auch das Verhältnis L3T4+/Lyt2+ im Thymus der Versuchstiere wurde erhöht. Im peripheren Blut der Mäuse wurde die Dichte der Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten im allgemeinen und speziell der Lymphozyten, die den Interleukin-2-Rezeptor als Aktivierungsmarker auf der Zelloberfläche exprimieren, sowie der Monozyten, die den Aktivierungsmarker MAC-3 exprimierten, nach Behandlung mit Mistellektin-1 gesteigert (Beuth, 1994). Im Blut von Krebspatienten erhöhte Mistellektin-1 die Dichte der T-Lymphozyten (CD4+, CD8+), der natürlichen Killerzellen und der B-Lymphozyten (Beuth, 1992). Ferner wurde eine Erhöhung des endogenen Opiatmediators  $\beta$ -Endorphin im Blutplasma von Mammakarzinompatientinnen nach Applikation von Mistellektin-1 nachgewiesen (Heiny, 1994). Zudem wurde nachgewiesen, daß Mistellektin-1 die zytotoxische Wirkung von peripheren, natürlichen Killerzellen gegenüber K-562-Tumorzellen und die Dichte von großen, granulären Lymphozyten (LGL) im peripheren Blut erhöht (Hajto, 1989). Eine antimetastatische Aktivität von Mistellektin-1 auf Sarkom-Zellen in Mäusen wurde belegt (Beuth, 1991).

Vorzugsweise weist das erfindungsgemäße Polypeptiddimer dasselbe Spektrum an biologischen Aktivitäten wie das natürliche Mistellektindimer auf.

Zur Darstellung von rML-Holoprotein aus den getrennt rekombinant synthetisierten Einzelketten wurde rMLB mit einem molaren Überschuß rMLA in Anwesenheit eines Glutathion Redox-Systems und Protein-Disulfid-Isomerase *in vitro* reassoziert. Das dem Heterodimer entsprechende rML-Holoprotein wurde unter Abtrennung freier rMLA und rMLA-Dimere durch Affinitätschromatographie an Lactosyl-Agarose aus dem Reassoziationsansatz isoliert und gereinigt. Mit analogen Vorgehen sind rMLA/MLB und MLA/rMLB heterodimere Holoproteine darstellbar.

Die Wirkung reassoziierter rMLA/MLB Holoproteine wurde durch Verfolgung der cytotoxischen Aktivität auf eine humane Monocytenleukämiezelllinie (MOLT4) getestet. Sowohl B-Kette (Oberflächenbindung) als auch A-Kette (enzymatische Ribosomeninaktivierung) leisten Beiträge zum beobachteten cytotoxischen Effekt. Ein *in vitro* reassoziertes rMLA/MLB Holoprotein wurde mit zwei Chargen natürlichem ML-Holoprotein verglichen und zeigt vergleichbar hohe cytotoxische Eigenschaften mit  $IC_{50}$ -Werten um 10pg/ml (Fig. 11), was die funktionelle Integrität des Reassoziats dokumentiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Polypeptiddimer als mindestens eines der Monomere ein chemisch oder enzymatisch modifiziertes erfindungsgemäßes Polypeptid oder ein

erfindungsgemäßes Fusionsprotein auf.

Durch Modifikationen können zum einen die Wirkungsstärken optimiert werden, als auch durch Ausschaltung einzelner Wirkqualitäten (z.B. Kohlenhydratbindungsstellen der B-Kette oder Glycosidaseaktivität der A-Kette) die therapeutischen Einsatzmöglichkeiten erweitert werden, indem eventuelle Nebenwirkungen ausgeschaltet werden. Polypeptide mit veränderten Eigenschaften können auch als Werkzeuge zur Aufklärung der Wirkmechanismen dienen. Für die Therapie wird es wahrscheinlich notwendig werden, die Antigenität und die Immunogenität der Polypeptide zu vermindern und/oder ihre pharmakokinetischen Eigenschaften zu optimieren.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Polypeptids oder Polypeptiddimers, wobei man den erfindungsgemäßen Wirt unter geeigneten Bedingungen züchtet und das so erhaltene Polypeptid oder Polypeptiddimer isoliert.

Dem Fachmann sind geeignete Bedingungen zur Züchtung und Isolierung des Wirtes bekannt. So kann beispielsweise das erfindungsgemäße Polypeptid oder Polypeptiddimer mittels eines geeigneten Expressionssystems aus dem Wirt ausgeschleust und im Medium gesammelt werden. Andererseits können die Polypeptide oder Polypeptiddimere in der Zelle verbleiben und aus dieser isoliert werden. Nachfolgend wird eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgestellt:

Zur Isolierung von rMLA erfolgte ein Gesamtzellausschluß der *E. coli* Zellen und eine Trennung löslicher von unlöslichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation. Eine Analyse der Zellfraktionen zeigte, daß die rekombinante Mistellektin A-Kette in Abhängigkeit von den Expressionsbedingungen und der Expressionsdauer zu 5 - 50 % in löslicher Form bzw. zu 50 - 95 % in Form unlöslicher Proteinaggregate ("inclusion bodies") akkumuliert.

Das Auftreten von löslichen und unlöslichen Proteinen ergibt, wenn eine Rückfaltung bzw. Renaturierung der rMLA-Proteine möglich ist, mindestens zwei Verfahren zur Isolierung von rMLA. Das zu "inclusion bodies" aggregierte rMLA wurde nach Waschen der Sedimente zur Entfernung von *E. coli* Proteinen [Babbitt et al., 1990] unter denaturierenden Bedingungen gelöst und durch 90-facheverdünnung in Faltungspuffer (50 mM Tris-HCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8,0) rückgefaltet.

Es ergaben sich nach dieser Prozedur einerseits lösliche, gefaltete Proteinspezies, die wie in Fig. 9 dargestellt, ebenso wie die renaturierten, ursprünglich unlöslichen, denaturierten rMLA Spezies voll enzymatisch aktiv sind. Eine Isolierung der renaturierten rMLA kann wie auch die Isolierung der löslichen rMLA durch Immunaффinitätschromatographie unter Verwendung des spezifischen anti-MLA-Antikörpers TA5 erfolgen.

Mit dem Vorliegen von rMLB in löslicher Form als auch in Form unlöslicher "inclusion bodies" ergeben sich zwei Verfahren zur Isolierung von rekombinanter

Mistellektin B-Kette.

Zur Isolierung der löslichen rMLB-Kette aus dem stark reduktiven Milieu des *E. coli* Cytoplasmas erfolgt zur Ausbildung der intrachenaren Disulidbrücken eine Inkubation in Anwesenheit eines Redox-Systems aus reduziertem und oxidiertem Glutathion sowie zur Stabilisierung aktiver Faltungsprodukte in Anwesenheit des Liganden  $\beta$ -Lactose. Aus dem Faltungsansatz wurde aktive, Carbohydrat-bindende rMLB-Kette durch Affinitätschromatographie an Lactosyl-Agarose in einem 1-Schritt-Verfahren selektiv isoliert bzw. gereinigt.

Zur Isolierung von rMLB aus dem unlöslichen, als "inclusion bodies" vorliegenden Expressionsproduktanteils wurde das Sediment des *E. coli* Gesamtzellauflusses zur Entfernung von *E. coli* Proteinen gewaschen [Babitt et al., 1990] und unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen gelöst. Die Renaturierung erfolgte durch Verdünnung in Anwesenheit eines Redox-Systems aus reduziertem und oxidiertem Glutathion sowie des Liganden  $\beta$ -Lactose, wobei aktive Carbohydrat-bindende rMLB-Kette durch Affinitätschromatographie an Lactosyl-Agarose selektiv aus dem Renaturierungsansatz isoliert und gereinigt werden.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Arzneimittel, das das erfindungsgemäße Polypeptid und/oder das erfindungsgemäße Polypeptiddimer und/oder das nachstehend beschriebene erfindungsgemäße Immuntoxin, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger enthält.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide, ihre Assoziate oder Modifikationen eignen sich für vielfältige Anwendungen in der Krebs- und Infektionstherapie, entsprechend den für das natürliche Mistellektin bekannten pharmakologischen Eigenschaften.

Die immunstimulierenden Wirkungen lassen sich für die Tumorthherapie nutzen, indem durch direkte und/oder indirekte Stimulation die körpereigene Immunabwehr befähigt wird, den Tumor und eventuelle Metastasen wirksamer zu bekämpfen. Dasselbe gilt auch für Infektionen, insbesondere virale Erkrankungen.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch mit anderen Immunstimulantien, z.B. Interferonen, Cytokinen oder koloniestimulierenden Faktoren, in Kombination gegeben werden, um synergistische Wirkungen zu erzielen bzw. die notwendige Dosis der Kombinationspartner zu reduzieren und damit deren Nebenwirkungen zu vermindern.

In Kombination mit Cytostatika oder Bestrahlung läßt sich die Nebenwirkung der Leukopenie/Myelosuppression mildern oder vermindern, so daß die durch diese derzeit üblichen Behandlungsmethoden hervorgerufene Schwächung des Immunsystems reduziert wird.

Die direkte cytotoxische Wirkung der Polypeptide mit Glycosidaseaktivität führt zu Apoptose von Tumorzellen und kann ebenfalls zur Therapie genutzt werden. Dieses Prinzip kann bei der Verwendung von Immuntoxinen spezifischer gestaltet werden, wenn man die erfindungsgemäßen Polypeptide an geeignete Antikör-

per koppelt. Somit betrifft die Erfindung ferner Immuntoxine, die mindestens ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder Polypeptiddimer umfassen. Beispielsweise kann eine Koppelung von aktiver A-Kette oder Holoprotein an Antikörper oder Fragmente hiervon mit proteinchemischen Methoden erfolgen. Solche Koppelungsverfahren sind dem Fachmann bekannt, die entsprechenden Konjugate vielseitig einsetzbar (Vitetta, 1993). Alternativ können auch entsprechend konstruierte Fusionsproteinkonstrukte zur Expression gebracht werden, die Antigen-bindende Domänen aus z.B. Antikörpern und zusätzlich cytotoxische Fragmente des erfindungsgemäßen Polypeptids enthalten.

Weiterhin läßt sich die Bildung von Metastasen verhindern, wenn die Bindung von Tumorzellen an andere Zellen inhibiert wird. Über kompetitive Lektinbindung kann mit dem erfindungsgemäßen Polypeptiden diese Bindung verhindert werden.

Schließlich betrifft die Erfindung diagnostische Zusammensetzungen, die mindestens enthalten:

- a) das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül;
- b) einen Primer und/oder ein Primerpaar, der/das spezifisch an das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül bzw. an den komplementären Strang dazu hybridisiert; und/oder
- c) das erfindungsgemäße Polypeptid und/oder das erfindungsgemäße Polypeptiddimer.

Die erfindungsgemäße diagnostische Zusammensetzung kann in der Ausführungsform, die den Primer bzw. das Primerpaar enthält, dazu benutzt werden, Organismen nach der Existenz eines Lektins abzusuchen, um so beispielsweise neue Lektine aufzufinden, die gegebenenfalls pharmakologisch interessante Lektine codieren.

#### Die Figuren zeigen

- Fig. 1 Konstruktion der primären Amplifikationsoligonukleotide
- Fig. 2 Primäres *Viscum album* ML-Amplifikationsprodukt
- Fig. 3 Klonierstrategie zur Darstellung des ML-Gens
- Fig. 4 Insertionen der Expressionsvektoren für rMLA und rMLB und vollständige ML-Gensequenz
- Fig. 5 Konstruktionsschema Expressionsvektor für rMLA
- Fig. 6 Konstruktionsschema Expressionsvektor für rMLB
- Fig. 7 Expression von rMLA, rMLB und immunologische Detektion
- Fig. 8 IEF Chromatofocussierung von rMLA und rMLB vs. nat. ML
- Fig. 9 Enzymatische Aktivität von rMLA (RIP)
- Fig. 10 Carbohydrat-Bindecharakteristik von rMLB

Fig. 11 Cytotoxizität des reassozierten rMLA/MLB Holoproteins

### Beispiel 1

#### Konstruktion der primären Amplifikationsoligonukleotide

Das Mistellektin (ML) gehört zur der Klasse der Ribosomeninaktivierenden Proteine [Stirpe et al., 1992], die eine in Pflanzen verschiedener taxonomischer Herkunft weit verbreitete Protein-Familie darstellt. ML wurde aufgrund der Aktivitäten seiner Unterheiten der Gruppe der Typ II Ribosomeninaktivierenden Proteinen zugeordnet [Endo et al., 1988a].

Zur Ermittlung der ML-Gensequenz ist der naheliegende Ansatz des Durchmusterens von *Viscum album* cDNA- und genomischen Genbanken jedoch ungeeignet. So konnten aus Genbanken aus *Viscum album* poly-A+ RNA trotz der Verwendung verschiedener DNA-Sonden keine ML-spezifischen Klone identifiziert werden. Mit der Annahme, daß die ML-Gensequenz keine Introns enthält, wurde deshalb eine PCR-Strategie angewandt. Da die N-terminalen Aminosäuresequenzen von der MLA- als auch der MLB-Kette bekannt waren [Dietrich et al., 1992; Gabius et al., 1992], erschien eine Amplifikation des MLA-codierenden Bereiches unter Verwendung von degenerierten, aus den bekannten Peptiden abgeleiteten Amplifikationsoligonukleotiden möglich (Fig. 1a). Während ein brauchbares Oligonukleotid mit geringem Degenerationsgrad aus dem N-Terminus der MLA-Kette abgeleitet werden kann (RMLA1, Fig. 1b), ist es nicht möglich, entsprechende Oligonukleotide mit ausreichender Spezifität aus dem N-Terminus der MLB-Kette zu konstruieren (RMLB1, RMLB2, RMLB3, Fig. 1b).

Es mußten deshalb alternative Strategien entwickelt werden, die durch das Einbeziehen von Proteindaten verwandter Proteine das Ableiten von Amplifikationsoligonukleotiden aus noch unbekannten ML-Sequenzbereichen ermöglichte. So zeigte eine Aminosäuresequenz-Analyse von Typ I und Typ II Ribosomen-inaktivierenden Proteinen eine Anzahl konservierter Bereiche mit hoher Sequenz-Homologie. Fig. 1c zeigt den hohen Verwandtschaftsgrad von Typ I und Typ II RIP am Beispiel des aktiven Zentrums von Ricin. Innerhalb des Sequenzmotivs MISEAARF wurde für E177 und R180 die Beteiligung am enzymatischen Mechanismus diskutiert [Kim et al., 1992; Lord et al., 1994]. Daraus wurde geschlossen, daß zumindest diese beiden Reste in der ML-Sequenz vorhanden sein sollten. Aus weiteren strukturellen Überlegungen hinsichtlich dem Vorhandensein einzelner Reste, wobei besonderes solche mit einem niedrigen Degenerationsgrad des Codon-Gebrauchs berücksichtigt wurden, resultierte die Konstruktion des Amplifikationsoligonukleotids RMLA2. Die Sequenz dieses Oligonukleotids ist in Fig. 1c dargestellt.

### Beispiel 2

#### Darstellung von ML-Gen spezifischen DNA-Fragmenten

Hochmolekulare, genomische DNA wurde ausgehend von frischen *Viscum album* Blättern (Wirtsbaum *Populus wilsonii*) nach der Methode nach Baur et al. [1993] isoliert. Zur Darstellung von ML-Gen spezifischen DNA-Fragmenten durch PCR wurden je Amplifikationsansatz 100 ng genomische DNA eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl, enthaltend PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0,25 mM dNTP, pH 8,3), 78 pmol Primer RMLA1 und 50 pmol (Ansatz 2) bzw. 100 pmol (Ansatz 1) RMLA2. Die PCR erfolgte mit Taq-DNA-Polymerase (1,5E/Ansatz) von Boehringer Mannheim mit einem Biometra Thermocycler. Die PCR-Parameter waren: 1 min Denaturierung 90°C, 1 min Annealing 50°C, 1 min Elongation 72 °C bei insgesamt 30 Zyklen. Die Amplifikationsprodukte wurden durch 5%ige Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid analysiert (Fig. 2). Das in Ansatz 2 erhaltene spezifische Amplifikationsprodukt mit einer Größe von etwa 500 bp wurde durch Gelelution isoliert und der Klonierung in TA-Vektoren zugeführt.

### Beispiel 3

#### Klonierungsstrategie

Die Ableitung der zur primären PCR eingesetzten Amplifikationsoligonukleotide ist in Beispiel 1 (Fig. 1a), die Darstellung des primären Genfragments des *Viscum album* ML-Gens, im Folgenden als "a" bezeichnet, ist in Beispiel 2 (Fig. 2) gezeigt. Ausgehend von der Sequenz des klonierten Genfragments "a" und der Annahme, daß das ML-Gen keine Introns besitzt, war es nun möglich, sequenzspezifische 5'-Oligonukleotide abzuleiten, mit denen eine Amplifikation der Fragmente "b", "c", "d" und "e" ermöglicht wurde. Während das 3'-Oligonukleotid für "c" ebenfalls aus der DNA-Sequenz von "a" abgeleitet wurde, mußte die Konstruktion der degenerierten 3'-Primer zur Amplifikation der Genfragmente "b", "d", "e" und "g" durch Analyse homologer Bereiche von Typ I ("b") und Typ II ("d", "e", "g") RIP-Proteinen erfolgen. Hierbei wurde wiederum aus den Sequenzvergleichen innerhalb der Protein-Familien auf das Vorhandensein einzelner Reste geschlossen, wobei besonders Reste mit geringem Degenerationsgrad des Codon-Gebrauchs berücksichtigt wurden. Insbesondere die bekannten Ricin und Abrin cDNA- und abgeleitete Protein-Sequenzen wurden zur Konstruktion von etwa 50 ML-spezifischen Oligonukleotid-Kombinationen herangezogen. In Fig. 3 sind nur die Genfragmente gezeigt, die als spezifische Amplifikationsprodukte klonierbar waren und einer weiteren Analyse zugeführt werden konnten. Ausgehend von

anderen Oligonukleotid-Kombinationen konnten keine ML-spezifischen Amplifikationsprodukte generiert werden. Die Darstellung der Genfragmente "f" (codierend für die MLA-Kette) und "g" (codierend für die MLB-Kette) ist im Detail in Beispiel 5 und Beispiel 6 beschrieben

Zur Analyse der 5'- und 3'-Regionen der translatierten und nicht-translatierten Sequenzbereiche des ML-Gens wurden Bedingungen zur 5'- und 3'-RACE [Frohmann et al., 1988] etabliert, die zur Generierung der Fragmente "h" und "i" und "j" führte. Die Amplifikation des Fragments "j" mit RACE-PCR ist damit eine alternative zur Darstellung von vollständigen MLB-Genfragmenten. Die RACE-Reaktionen wurden unter Verwendung von cDNA durchgeführt, die durch reverse Transkription von isolierter *Viscum album* Gesamt-RNA aus Mistelblättern (Wirtsbaum *Populus wilsonii*) präpariert wurde.

#### Beispiel 4

##### DNA-Sequenz und Translationsprodukte rMLA und rMLB

Die Insertionen der Expressionsvektoren pT7-MLA und pT7-MLB wurden durch Standardverfahren mittels "primer walking" Strategie (Ermittlung vollständig überlappender Sequenzen beider Stränge) unter Verwendung verschiedener ML-spezifischer Oligonukleotide sequenziert (Fig. 4 a, b). Die unterstrichenen Sequenzbereiche bezeichnen Restriktionsschnittstellen zur Klonierung in die pT7-Expressionsvektoren. Beide Genfragmente sind entsprechend dem Konstruktionschema der Expressionsvektoren wie in Beispiel 5 und Beispiel 6 beschrieben modifiziert. Fig. 4c zeigt die aus den bezeichneten Fragmenten abgeleitete vollständige ML-Gensequenz. Sie umfaßt auch 5'- und 3'-nicht-translatierte Bereiche sowie Endopeptid- und Signalpeptid-codierende Abschnitte.

#### Beispiel 5

##### Konstruktion des Expressionsvektors pT7-MLA

Zur heterologen Expression wurde die für die Mistellektin A-Kette codierende Sequenz durch spezifische PCR ausgehend von komplexer genomischer Mistel-DNA dargestellt und terminal modifiziert. Über nicht-komplementäre Bereiche der eingesetzten Primer-Oligonukleotide wurden hierbei Translations-Kontrollelemente sowie Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen angefügt, wodurch ausgehend von dem genomisch vorliegenden Präpromistellektin-Gen die Klonierung und getrennte Expression der Mistellektin A-Kette ermöglicht wurde.

Fig. 5b zeigt die Darstellung von MLA-codierenden Gen-Fragmenten durch PCR. Zur Amplifikation der MLA-codierenden Gensequenz wurden 200 ng genomische

*Viscum album* DNA, 1,5 mM (Ansatz 1) bzw. 2,5 mM (Ansatz 2) Magnesiumchlorid, 40 pmol von jedem Primer Oligonukleotid RML16 und RML17 in PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,25 mM von jedem dNTP, pH 8,3) in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Die PCR erfolgte unter Verwendung von Taq-Polymerase (1,5U/Ansatz, Boehringer Mannheim) durch insgesamt 30 Zyklen des Temperaturprofils 1 min Denaturierung 94 °C, 1 min Annealing 52 °C, 1,5 min Elongation 72 °C. Die Amplifikationsprodukte wurden durch 1%ige Agarosegel-Elektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid analysiert (Fig. 5b) und durch Gelelektion der Klonierung in TA-Vektoren zugeführt.

Der 5'-Bereich der für rMLA codierenden Sequenz entsprechend der Aminosäurereste Tyrosin<sup>1</sup> - Tyrosin<sup>17</sup> [Dietrich et al., 1992; Gabius et al., 1992] wurde unter Vorschaltung eines Translations-Startcodons als synthetisches Genfragment durch Hybridisierung und Klonierung zweier Oligonukleotide dargestellt. Hierdurch wurde eine Optimierung der Gensequenz hinsichtlich der Codon-Auswahl, wie sie für stark exprimierte Gene in *Escherichia coli* beschrieben ist [Gribskov et al., 1984], erzielt. Am 3'-Ende des synthetischen rMLA-Genfragments sowie am 5'-Ende des mittels PCR dargestellten rMLA-Genfragments wurde durch den gezielten Austausch des Tyrosin<sup>17</sup>-Codons von TAC zu TAT eine *Ssp I* - Restriktionsschnittstelle eingeführt, die eine Fusion der beiden rMLA-Genfragmente unter Darstellung des Vektors pML14-17 (Beispiel 5, Fig. 5) ermöglichte.

Die generierte vollständige für rMLA codierende Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt (Fig. 4a). Zur Expression von rMLA in *Escherichia coli* wurde die Gensequenz aus dem Vektor pML14-17 isoliert und durch Insertion in den Expressionsvektor pT7-7 unter die Kontrolle des T7-RNA Polymerase Promotors sowie Transkriptionsterminators gestellt. Mit dem resultierenden Expressionsvektor pT7-MLA (Fig. 5) wurde der *E. coli* Expressionsstamm BL21 transformiert.

#### Beispiel 6

##### Konstruktion des Expressionsvektors pT7-MLB

Zur heterologen Expression der Mistellektin B-Kette wurde die vollständige, MLB codierende Sequenz durch spezifische PCR aus komplexer genomischer *Viscum album* DNA amplifiziert, wobei über nicht-komplementäre Bereiche der eingesetzten Primer-Oligonukleotide Translationskontrollelemente sowie Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen eingeführt wurden.

Fig. 6b zeigt die Darstellung des gesamten, rMLB vollständig codierenden Genfragments durch PCR. Die Amplifikation des rMLB-codierenden DNA-Fragments erfolgte ausgehend von jeweils 200 ng genomischer *Viscum album* DNA in PCR-Ansätzen mit 50 pmol Pri-

mer-Oligonukleotid RML25 und 30 pmol (Ansatz 1) bzw. 10 pmol (Ansatz 2) Primer-Oligonukleotid RML26 in einem Gesamtvolumen von 50 µl PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM von jedem dNTP, pH 8,3). Die PCR erfolgte unter Verwendung von Taq-Polymerase (1,5 E/Ansatz, Boehringer Mannheim) durch 30 Zyklen aus 1 min Denaturierung 94 °C, 1 min Annealing 52 °C und 1,5 min Elongation 72 °C. Die PCR-Produkte wurden durch 1%ige Agarosegel-Elektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid analysiert. Es resultierte ein 0,8 kbp PCR-Produkt, das durch Gelelution isoliert und der Klonierung in TA-Vektoren zugeführt wurde. Durch Insertion in den Expressionsvektor pT7-7 wurde das rMLB-codierende Genfragment unter die Kontrolle von Transkriptionskontrollelementen gestellt und mit dem resultierenden Expressionsvektor pT7-MLB der Expressionsstamm *E. coli* BL21 transformiert. Die Integrität der PCR-generierten, vollständigen, für rMLB-codierenden Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt (Fig. 4b).

### Beispiel 7

#### Expression, immunologischer Nachweis, Rückfaltung und *in vitro* Reassoziierung von rMLA und rMLB

##### (I) Expression von rMLA in *E. coli*

Zur Expression von rekombinanter Mistellektin A-Kette wurden 1000 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium in 2 Ltr. Schüttelkolben mit Schikanen mit 5 ml einer stationär gewachsenen LB<sub>Amp</sub>-Vorkultur von *E. coli* BL21/pT7-MLA angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln kultiviert, wobei das Wachstum durch Trübungsmessung bei 578 nm verfolgt wurde. Die Genexpression wurde bei Erreichen einer Zelldichte entsprechend OD<sub>578</sub> Å 0,9 - 1,0 durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Zur Ernte wurden die Zellen 2 h nach Induktion durch Zentrifugation 20 min bei 5.000 rpm und 4 °C im GS-3 Rotor (Sorvall) sedimentiert und das Kulturmedium dekantiert, wobei ausgehend von 1 Ltr. Kulturvolumen eine Zellmasse von 3 - 4 g (Feuchtgewicht) isoliert wurde.

Der Zellaufschluß erfolgte mittels French-Press (SLM Instruments), wozu das Zellsediment in 20 ml Aufschlußpuffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 8,0) resuspendiert und durch 2 French-Press Durchgänge bei 1.500 psi aufgeschlossen wurde. Durch eine anschließende Zentrifugation für 30 min bei 10.000 UpM und 4 °C im SS-34 Rotor (Sorvall) wurden unlösliche Zellbestandteile sowie enthaltene "inclusion bodies" sedimentiert und von den im Überstand verbleibenden löslichen *E. coli* Proteinen bzw. löslichen Expressionsprodukten getrennt.

Zur Analyse der Expression wurden gleiche Volumina der Zellaufschlußfraktionen durch 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Coomassie-Brillant-Blau Färbung sowie durch Western-Blot unter Ver-

wendung des MLA-spezifischen Antiserums TA5 untersucht (Fig. 7a). Hierzu wurden gleiche Volumen der löslichen Fraktion (Spur 2, 4, 6, 8) sowie der unlöslichen "inclusion bodies" Fraktion (Spur 1, 3, 5, 7) des *E. coli* Aufschlusses hinsichtlich des Gehaltes an rMLA untersucht. Zur Darstellung des Expressionsverlaufes wurden dabei Proben vor (Spur 1+2), 2 h (Spur 3+4), 4 h (Spur 5+6) und 6 h (Spur 7-8) nach Induktion der Genexpression eingesetzt. Die Expression ist schon 1 h nach Induktion durch das Auftreten eines immunreaktiven 25 kDa Expressionsproduktes entsprechend rMLA gekennzeichnet, deren Expressionsmaximum bereits 2 h nach Induktion erreicht ist. Die Verteilung von rMLA auf die lösliche bzw. unlösliche Zellaufschlußfraktion beträgt 2 h nach Induktion jeweils ~50 %, wobei eine längere Expressionsdauer zu einer zunehmenden Bildung unlöslicher "inclusion bodies" führt.

##### (II) Isolierung von rMLA aus unlöslichen "inclusion bodies"

Das Sediment des *E. coli* Gesamtzellaufschlusses wurde zur Entfernung von *E. coli* Proteinen 2x mit je 20 ml STET-Puffer (50 mM Tris-HCl, 8 % (w/v) Sucrose, 50 mM EDTA, 0,05 % (v/v) Tween-20, pH 7,4) nach Babitt et al. [1990] gewaschen. Das verbleibende Sediment mit den enthaltenen "inclusion bodies" wurde in 20 ml Denaturierungspuffer (6 M Guanidiniumchlorid, 100 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) durch Inkubation 16 h bei Raumtemperatur unter Schütteln gelöst.

Zur Renaturierung von rMLA wurde die im Denaturierungspuffer vorliegende Proteinlösung in das 90-fache Volumen Faltungspuffer (50 mM Tris-HCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8,0) langsam eingetropft und 16 h bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Wieder ausgefallenes Protein wurde durch Zentrifugation 30 min bei 6.000 rpm und 4 °C im GS-3 Rotor (Sorvall) abgetrennt. Der rMLA-haltige Überstand wurde zur Lagerung auf 20 % (v/v) Glycerin eingestellt und bei 4 °C aufbewahrt.

##### (III) Reinigung von rMLA durch Immunaффinitätschromatographie

Zur 1-Schritt-Reinigung von rMLA (löslicher Expressionsproduktanteil bzw. rückgefaltetes Protein) durch Immunaффinitätschromatographie wurden 260 µg des gegen Mistellektin A-Kette gerichteten, monoklonalen Antikörpers anti-nMLA-IgG (TA5) an Protein-A-Sepharose CL4B (Sigma, Deisenhofen) kovalent nach der Methode von Harlow & Spur [1988] immobilisiert. Nach Inkubation der Immunaффinitätsmatrix mit der rMLA-Probe und Waschen der Matrix mit 10 Säulenbettvolumen Waschpuffer 1 (1 M NaCl, 10 mM Phosphat-Puffer, pH 7,0) und 10 Säulenbettvolumen Waschpuffer 2 (10 mM Phosphat-Puffer, pH 7,0) zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde spezifisch gebundene rMLA mit Elutionspuffer (0,1 M

Glycin, pH 2,5) eluiert. Die Elution erfolgte zur Rückstellung des pH-Wertes in eine Vorlage von 1 M Phosphat-Puffer, pH 8,0.

#### (IV) Expression von rMLB in *E. coli*

Zur Expression von rekombinanter Mistellektin B-Kette wurden 1000 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium in 2 Ltr. Schüttelkolben mit Schikanen mit 5 ml einer stationär gewachsenen LB<sub>Amp</sub>-Vorkultur von *E. coli* BL21/pT7-MLB angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln kultiviert, wobei das Wachstum durch Trübungsmessung bei 578 nm verfolgt wurde. Die Genexpression wurde bei Erreichen einer Zelldichte entsprechend OD<sub>578</sub> Å 0,9 - 1,0 durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Zur Ernte wurden die Zellen 4 h nach Induktion durch Zentrifugation 20 min bei 5.000 UpM und 4 °C im GS-3 Rotor (Sorvall) sedimentiert und das Kulturmedium dekantiert.

Der Zellaufschluß erfolgte mittels French-Press™ (SLM Instruments), wozu das Zelisediment in 20 ml Aufschlußpuffer B (20 mM Phosphat-Puffer, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7,2) resuspendiert und durch 2 French-Press Durchgänge bei 1.500 psi aufgeschlossen wurde. Durch eine anschließende Zentrifugation für 30 min bei 10.000 UpM und 4 °C im SS-34 Rotor (Sorvall) wurden unlösliche Zellbestandteile sowie enthaltene "inclusion bodies" sedimentiert und von den im Überstand verbleibenden löslichen *E. coli* Proteinen bzw. löslichem Expressionsprodukt getrennt.

Zum Nachweis der Expression wurden gleiche Volumina der Zellaufschlußfraktionen durch 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Coomassie-Brilliant-Blau Färbung sowie durch Western-Blot unter Verwendung des MLB-spezifischen Antiserums TB33 untersucht (Fig. 7b). Hierzu wurden gleiche Volumen der löslichen Fraktion (Spur 2, 4, 6, 8) sowie der unlöslichen "inclusion bodies" Fraktion (Spur 1, 3, 5, 7) des *E. coli* Aufschlusses hinsichtlich des Gehaltes an rMLB untersucht. Zur Darstellung des Expressionsverlaufes wurden dabei Proben vor (Spur 1+2), 2 h (Spur 3+4), 4 h (Spur 5+6) und 6 h (Spur 7-8) nach Induktion der Genexpression eingesetzt. Die Western-Blot Analyse zeigte bereits 1 h nach Induktion das Auftreten einer immunreaktiven 31 kDa Protein-bande entsprechend rMLB, wobei das Expressionsmaximum 4 h nach Induktion erreicht wurde. 4 h nach Induktion verteilt sich die rMLB-Menge zu jeweils ~ 50% auf die lösliche bzw. unlösliche Fraktion des Zellaufschlusses. Längere Inkubationszeiträume führen zu einer zunehmenden Akkumulation exprimierter rMLB in Form unlöslicher "inclusion bodies".

#### (V) Isolierung von rMLB aus unlöslichen "inclusion bodies"

Das Sediment des *E. coli* Gesamtzellaufschlusses wurde zur Entfernung von *E. coli* Proteinen 2x mit je 20 ml STET-Puffer (50 mM Tris-HCl, 8 % (w/v) Sucrose, 50

mM EDTA, 0,05 % (v/v) Tween-20, pH 7,4) nach Babbitt et al. [1990] gewaschen. Das verbleibende Sediment mit den enthaltenen "inclusion bodies" wurde in 20 ml Denaturierungspuffer (6 M Guanidiniumchlorid, 100 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) durch Inkubation 16 h bei Raumtemperatur unter Schütteln gelöst.

Zur Renaturierung von rMLB wurde die im Denaturierungspuffer vorliegende Proteinlösung in das 90-fache Volumen Faltungspuffer (20 mM Phosphat-Puffer, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM Glutathion reduziert, 1 mM Glutathion oxidiert, 10 mM  $\beta$ -Lactose, pH 7,2) langsam eingetropft und 16 h bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Wieder ausgefallenes Protein wurde durch Zentrifugation 30 min bei 6.000 UpM und 4 °C im GS-3 Rotor (Sorvall) von der löslichen, gefalteten rMLB-Fraktion abgetrennt.

#### (VI) Isolierung von rMLB durch Affinitätschromatographie an Lactosyl-Agarose

Zur Isolierung von aktiver, Carbohydrat-bindender rMLB wurde eine Lactosyl-Agarose Affinitätsmatrix (Sigma, Deisenhofen) mit 10 Säulenbettvolumen Chromatographiepuffer (20 mM Phosphat-Puffer, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,2) äquilibriert. Der Probenauftrag erfolgte durch "batch" Inkubation der Affinitätsmatrix in rMLB-haltigen Probenlösung für mind. 2 h bei Raumtemperatur. Nach Waschen der Affinitätsmatrix mit Chromatographiepuffer zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine wurde gebundenes rMLB durch kompetitive Verdrängung mit 0,3 M  $\beta$ -Lactose in Chromatographiepuffer eluiert.

#### (VII) *In vitro* Reassoziaton von Mistellektin-Ketten zur Darstellung des Holoproteins

Zur Darstellung von rekombinantem Mistellektin-Holoprotein wurde isolierte Mistellektin B-Kette mit einem molaren Überschuß an rMLA in 20 mM Phosphat-Puffer, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,2 für 16 - 48 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Ausbildung der interchenaren Disulfidbrücke erfolgte die Inkubation in Anwesenheit eines Redox-Systems aus 6 mM Glutathion (Verhältnis reduziert zu oxidiert 5 : 1) oder 10 mM Glutathion (Verhältnis reduziert zu oxidiert 2 : 1) + 1  $\mu$ M Protein-Disulfid-Isomerase (Boehringer, Mannheim). Nachweis und Identifizierung des gebildeten Heterodimers erfolgte durch SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen und anschließende Western-Blot Analyse unter Verwendung spezifischer, monoklonaler Antikörper gegen Mistellektin A-Kette (TA5) bzw. Mistellektin B-Kette (TB33). Die Isolierung des gebildeten Holoproteins bzw. Abtrennung freier rMLA bzw. rMLA-Aggregaten erfolgte durch Affinitätschromatographie an Lactosyl-Agarose wie unter (VI) beschrieben.

### Beispiel 8

#### Isoelektrische Homogenität von rMLA und rMLB

1-2 µg rMLA, natürliches MLA, rMLB, natürliches MLB oder ML-Holoprotein wurden zusammen mit IEF-Proteinstandards (BioRad, USA) auf Servalyt PreNets IEF-Gelen (pH 3 -10, 125 x 125 mm, 150 µm, Serva Heidelberg) fokussiert. Zum Nachweis wurden die Proteine durch "semi-dry electrophoresis" auf Nitrocellulose-Membranen (0,2 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) immobilisiert. Die immunologische Färbung erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen, MLA-spezifischen Antiserums (TA5 aus Maus) für rMLA und nMLA bzw. mit Hilfe eines monoklonalen, MLB-spezifischen Antiserums (TB33 aus Maus) für rMLB, nMLB und ML-Holoprotein. Immunkomplexe wurden unter Verwendung eines mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-Maus IgG-IgG (Sigma, Deisenhofen) und Umsetzung der Substrate NBT und BCIP angefärbt (Fig. 8).

Diskussion der Ergebnisse erfolgt in der obigen Beschreibung unter "Untersuchung der Eigenschaften von rMLA und rMLB, Punkt (II) Isoelektrische Homogenität.

### Beispiel 9

#### Nachweis der enzymatischen, Ribosomen-inaktivierenden Aktivität von rMLA

Die Proteinkonzentration der mittels Immunaффinitätschromatographie gereinigten rMLA (refolded) und rMLA (soluble) sowie von natürlicher MLA-Kette (nMLA) wurde nach Bradford [1976] unter Verwendung eines BSA-Standards bestimmt.

Zum Nachweis und Quantifizierung der enzymatischen rRNA-N-Glycosidase-Aktivität von MLA wurde unter Verwendung des "TNT coupled reticulocyte system" (Promega, USA) ein nichtradioaktives Testsystem etabliert. Je Ansatz wurden gleiche Mengen (20 µl) des TNT-Systems 15 min bei 30 °C vorinkubiert. Zur Quantifizierung einer Translationsinhibition wurden den Kontrollansätzen 2 µl des entsprechenden Puffers bzw. den Testansätzen 2 µl steigender MLA-Verdünnungen (Konzentrationsbereich 350 - 0 pM) zugesetzt. Aus jedem Ansatz wurden im Abstand von 8 min 2 Proben entnommen und zum Abstoppen der Reaktion in flüssigem Stickstoff eingefroren. Als Maß für die Translations-Aktivität wurde die relative Luciferase-Menge (sqrt-cpm) durch einen Biolumineszenz-Test mittels Szintillationsmeßgerät bestimmt. Für jeden Ansatz wurde hierbei die Differenz der gemessenen sqrt-cpm der beiden Zeitproben als Maß der relativen Translations-Aktivität ermittelt, wobei die Aktivität im Kontrollansatz ohne RIP auf 0 % Inaktivierungsrate (IAR) gesetzt wurde.

Durch Auftragung der relativen Translations-Inaktivierungsrate gegen die eingesetzten rMLA-Konzentrationen wurde mittels nichtlinearer Regression diejenige

Proteinkonzentration ermittelt, die zu 50 % Inhibition der Translationsaktivität im Vergleich zum Kontrollansatz führt. Dieser IC<sub>50</sub>-Wert stellt eine System-abhängige Größe dar, die einen Nachweis und Quantifizierung der enzymatischen Aktivität von rMLA (soluble), rMLA (refolded) im Vergleich zu nMLA ermöglicht (Fig. 9).

Fig. 9 zeigt den Nachweis der enzymatischen, Ribosomen-inaktivierenden Aktivität der rekombinanten MLA-Kette, wobei sowohl durch Isolierung des löslichen Expressionsproduktanteils (rMLA soluble) als auch durch Rückfaltung des aus "inclusion bodies" isolierten Proteins (rMLA refolded) enzymatisch aktives Expressionsprodukt erhalten wird. rMLA (soluble) und rMLA (refolded) weisen mit IC<sub>50</sub>-Werten von 10,7 ± 1,3 pM bzw. 15,6 ± 6,6 pM übereinstimmende Aktivitäten auf. Sie weisen damit eine niedrigere toxische Aktivität auf als die natürliche MLA-Kette (IC<sub>50</sub> 1,1 ± 0,7 pM).

### Beispiel 10

#### Carbohydrat-bindende Aktivität der Mistellektin B-Kette

100 µl einer Lösung von 1,1 mg Asialofetuin (Sigma, Deisenhofen) in 11 ml PBS wird in die Kavitäten von MaxiSorp C96 Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) gegeben und zur Beschichtung mit der galaktosyl-haltigen Schicht 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen der Mikrotiterplatten 3 x mit 150 µl / Kavität PBS-T (10 mM Natriumphosphat-Puffer, 130 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20, pH 7,2) wurde die Mikrotiterplatte zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 200 µl / Kavität PBS-T-1% BSA (10 mM Natriumphosphat-Puffer, 130 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20, 1 % (w/v) BSA, pH 7,2) für 1 h bei 36 °C inkubiert und anschließend wieder wie beschrieben gewaschen. Zum Test wurden 100 µl B-Ketten haltiger Präparationen oder ML-1 Referenzlösungen im Konzentrationsbereich von 10 - 200 ng/ml eingesetzt, wobei die entsprechenden Verdünnungsreihen in PBS-0,05% BSA (10 mM Natriumphosphat-Puffer, 130 mM NaCl, 0,05 % (w/v) BSA, pH 7,2) erstellt wurden. Pro Probenkonzentration und Kontrolle wurden 2-3 Replikas angelegt. Die Bestimmung des Leerwertes erfolgt mit PBS-0,05% BSA oder dem jeweiligen Präparationspuffer. Die Platten wurden nach Beladung 2 h bei 36 °C inkubiert und anschließend wie beschrieben gewaschen. In die belegten Kavitäten wurde 100 µl / Kavität anti-Mistellektin-Serum aus Ziege (1:19800 Verdünnung des Serumpools in PBS-T-0,1% BSA-Tx (10 mM Natriumphosphat-Puffer, 130 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20, 0,1 % (w/v) BSA, 1 % (v/v) Triton X100, pH 7,2)) gegeben, 2 h bei 36 °C inkubiert und anschließend wie beschrieben gewaschen. Zum Nachweis der Immunkomplexe wurde je belegte Kavität 100 µl anti-Ziege IgG-IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (Sigma, Deisenhofen) in einer 1 : 3500 Verdünnung in PBS-1% BSA (10 mM Natriumphosphat-Puffer, 130 mM NaCl, 1 % (w/v) BSA, pH 7,2) zugege-

ben und 1 h bei 36 °C inkubiert. Die Kavitäten wurden anschließend 6x mit 150 µl/Kavität PBS-T gewaschen. Zur Entwicklung wurden 100 µl / Kavität Substratlösung (1 o-Phenylendiamin-Tablette (Sigma, Deisenhofen) in 25 ml 65 mM Citronensäure, pH 5,0 + 10 µl 30 % Wasserstoffperoxid) zugegeben und 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 100 µl / Kavität 1 M Schwefelsäure. Die Auswertung erfolgte durch Absorptionsmessung bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm.

Fig. 10 zeigt eine Auftragung der im ELLA-System beobachteten Verdrängung von rMLB und nML Lektinen vom immobilisierten Asialofetuinliganden durch steigende Mengen D-Galactose. Die Bindecharakteristiken von MLB und rMLB, ausgedrückt durch den IC50 Wert bei halbmaximaler Verdrängung durch Galactose von nML 1,65 mM und rMLB 1,3 mM unterscheiden sich.

#### Beispiel 11

##### Bestimmung der Cytotoxizität *in vitro* reassoziierter rML-Holoproteine auf humane lymphatische Leukämiezellen

Die Integrität des Mistellektin-Holoproteins wurde durch die quantitative Bestimmung der Cytotoxizität gegenüber der humanen lymphatischen Leukämiezelllinie MOLT-4 (European Collection Of Animal Cell Cultures No. 85011413) nachgewiesen.

MOLT-4 Zellen wurden in serumfreiem MDC-1 Medium (PAN SYSTEMS, Aidenbach) kultiviert und für den Test auf eine Einsaat Zelldichte von  $1,6 \times 10^5$  MOLT-4-Zellen/ml bei einer Viabilität > 98 % eingestellt. Zur Bestimmung der Cytotoxizität wurden pro Kavität einer 96-Loch Mikrotiterplatte 90 µl einer MOLT-4 Zellsuspension entsprechend 15000 Zellen/Kavität eingesät und mit 10 µl der Probenlösung versetzt. Zum Test wurde Mistellektin-Holoprotein Präparationen (Chargen 220793 und BR1294) sowie *in vitro* reassoziertes rMLA/MLB Holoprotein im Konzentrationsbereich 0,05 - 200 pg/ml entsprechend 0,8 fM - 3,32 pM eingesetzt, wobei die entsprechenden Verdünnungsreihen in MDC-1 Zellkulturmedium erstellt wurden. Pro Probenkonzentration und Kontrolle wurden 6 Replikas angelegt. Die Zellen wurden 72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im begasten Brutschrank inkubiert. Die Quantifizierung des cytotoxischen Effektes erfolgte durch die Bestimmung der Viabilität der Zellen mit Hilfe eines löslichen Formazan-Farbstoffes nach der XTT-Methode oder WST-1 Methode [Scudiero et al., 1988] unter Verwendung des entsprechenden Cell Proliferation Kit II XTT (Boehringer, Mannheim) bzw. Cell Proliferation Reagent WST-1 (Boehringer Mannheim).

Diskussion der Ergebnisse erfolgt in der obigen Beschreibung unter "Untersuchung der Eigenschaften von rMLA und rMLB, Punkt (V) Cytotoxizität *in vitro*

assoziierter ML-Holoproteine.

#### Literatur

Babbitt, P.C., West, B.L., Buechter, D.D., Kuntz, I.D. und Kenyon, G.L. [1990]: Removal of a proteolytic activity associated with aggregates formed from expression of creatine kinase in *Escherichia coli* leads to improved recovery of active enzyme. *Bio/Technology* 8, 945-949.

Baur, A., Buschinger, A. und Zimmermann, F.K. (1993): Molecular cloning and sequencing of 18S rDNA fragments of six different ant species. *Ins. Soc.* 40, 325-335.

Beuth, J., Ko, H.L., Gablus, H.-J. und Pulverer, G. [1991]: Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of the β-galactoside-specific lectin from Mistletoe on tumor colonization in BALB/c-mice for two experimental model systems. *in vivo* 5, 29-32.

Beuth, J., Ko, H.L., Gabius, H.-J., Burrichter, H., Oette, K. und Pulverer, G. [1992]: Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients. *Clin. Investig.* 70, 658-661.

Beuth, J., Ko, H.L., Tunggal, L., Steuer, M.K., Geisel, J., Jeljaszewicz, J. und Pulverer, G. [1993]: Thymocyte proliferation and maturation in response to galactoside-specific Mistletoe Lectin-1. *in vivo* 7, 407-410.

Beuth, J., Ko, K.L., Tunggal, L., Geisel, J. und Pulverer, G. [1993]: Vergleichende Untersuchungen zur immunaktiven Wirkung von Galaktosid-spezifischem Mistellektin. *Arzneim. Forsch.* 43, 166-169.

Bocci, V. [1993]: Mistletoe (*Viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. *J. of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 7, 1-6.

Beuth, J., Ko, H.L., Tunggal, L., Buss, G., Jeljaszewicz, J., Steuer, M.K. und Pulverer, G. [1994]: Immunaktive Wirkung von Mistellektin-1 in Abhängigkeit von der Dosierung. *Arzneim. Forschung* 44, 1255-1258.

Bradford, M.M. [1976]: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Dietrich, J.B., Ribéreau-Gayon, G., Jung, M.L.,



- Franz, H., Beck, J.P. und Anton, R. [1992]: Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins. *Anti-Cancer Drugs* **3**, 507-511. 5
- Eifler, R., Pfüller, K., Göckeritz, W. und Püller, U. [1994]: Improved procedures for isolation and standardization of mistletoe lectins and their subunits: implications for the analysis of lectin pattern of the european mistletoe. In: *Lectins Biology-Biochemistry Clinical Biochemistry* (Bog-Hansen, Hrsg.) Vol. 9, M/S Wiley, New Delhi. 10
- Endo, Y., Tsurugi, K. und Franz, H. [1988a]: The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett.* **231**, 378-80. 15
- Endo, Y., Tsurugi, K. und Lambert, J.M. [1988b]: The site of action of six different ribosominactivating proteins from plants on eukaryotic ribosomes: the RNA N-glycosidase activity of the proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**, 1032-1036. 20
- Erlich, H.A., Gelfand, D.H. und Saiki, R.K. [1988]: Specific DNA amplification. *Nature* **331**, 461. 25
- Franz, H., Haustein, B., Luther, P., Kuropka, U. und Kindt, A. [1977]: Isolierung und Charakterisierung von Inhaltsstoffen der Mistel (*Viscum album* L.) I. Affinitätschromatographie an fixierten Plasmaproteinen. *Acta biol. med. germ.* **36**, 113-117. 30
- Frohman, M.A., Dush, M.K. und Martin, G.R. [1988]: Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single genespecific oligonukleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002. 35
- Gabius, H.-J., Walzel, H., Joshi, S.S., Kruip, J., Kojima, S., Gerke, V., Kratzin, H. and Gabius, S. [1992]: The immunomodulatory  $\beta$ -galactoside-specific lectin from Mistletoe: Partial sequence analysis, cell and tissue binding, and impact on intracellular biosignalling of monocytic leukemia cells. *Anticancer Res.* **12**, 669-676. 40
- Gabius, H.-J., Gabius, S., Joshi, S.S., Koch, B., Schroeder, M., Manzke, W.M. und Westerhausen, M. [1993]: From ill-defined extracts to the immunomodulatory lectin: Will there be a reason for oncological application of Mistletoe? *Planta Med.* **60**, 2-7. 45
- Gabius, H.-J. und Gabius, S. [1994]: Die Mistletoe- 50
- rapie auf dem naturwissenschaftlichen Prüfstand. *PZ* **139**, 9-16.
- Ganguly, C. und Das, S. [1994]: Plant Lectins as inhibitors of tumor growth and modulators of host immune response. *Chemotherapy* **40**, 272-278.
- Garcia-Olmedo, F., Carbonero, P., Hernandez-Lucas, C., Paz-Ares, J., Ponz, F., Vicente, O. und Sierra, J.M. [1983]: Inhibition of eukaryotic cell-free protein synthesis by thionins from Wheat endosperm. *Biochim. Biophys. Acta* **740**, 52-56.
- Gribskov, M., Devereux, J. und Burgess, R. [1984] *Nucl. Acids Res.* **12**, 539-549.
- Hajto, T. [1986]: Immunomodulatory effects of Iscador: A *Viscum album* preparation. *Oncology* **43** suppl.1, 51-65.
- Hajto, T., Hostanska, K. und Gabius, H.-J. [1989]: Modulatory potency of the  $\beta$ -galactoside-specific lectin from Mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in Rabbits and Patients. *Cancer Res.* **49**, 4803-4808.
- Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. und Gabius, H.-J. [1990]: Increased secretion of Tumor necrosis factor  $\alpha$ , Interleukin 1, and Interleukin 6 by Human Mononuclear Cells exposed to  $\beta$ -Galactosidespecific lectin from clinically applied Mistletoe extract. *Cancer Res.* **50**, 3322-3326.
- Harlowe, E. und Spur, D. [1988] In: *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Heiny, B.-M. und Beuth, J. [1994]: Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-1) induces  $\beta$ -endorphin release and immunopotential in breast cancer patients. *Anticancer Research* **14**, 1339-1342.
- Hülsemann, H., Doser, C. und Mechelke, F. [1986]: Differences in the in vitro effectiveness of preparations produced from Mistletoes of various host trees. *Drug. Res.* **36**, 433-436.
- Janssen, O., Scheffler, A. und Kabelitz, D. [1993] In vitro Effects of Mistletoe Extracts and Mistletoe Lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). *Arzneim. forsch.* **43**, 1221-1227
- Katzin, B.J., Collins, E.J. und Robertus, J.D. [1991]: Structure of Ricin A-Chain at 2.5 Å. *Proteins* **10**, 251-259.

Kim, Y., Misna, D., Monzingo, A.F., Ready, M.P., Frankel, A., und Robertus, J.D. [1992]: Structure of a Ricin mutant showing rescue of activity by a non-catalytic residue. *Biochemistry*, **31**, 3294-3296.

Lord, J.M., Roberts, L.M. und Robertus, J.D. [1994]: Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J.* **8**, 201-208.

Männel, D.N., Becker, H., Gundt, A., Kist, A. und Franz, H. [1991]: Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *Viscum album*. *Cancer Immunol. Immunother.* **33**, 177-182.

Minowada, J., Ohnuma, T., Moore, G.E. [1972] 15  
Rosetteforming human lymphoid cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.* **49**, 891-895

Mendez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G.G., Mendez, R., Soriano, F., Salinas, M. 20  
und de Haro, C. [1990]: Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, g-hordothionin, from barley endosperm. *Eur. J. Biochem.* **194**, 533-539.

Rutenber, E. und Robertus, J.D. [1991]: Structure of Ricin B-chain at 2.5 Å resolution. *Proteins* **10**, 260-269.

Scudiero, P.A. et al. [1988] *Cancer Res.* **48**, 4827-4823. 30

Stein, G. und Berg, P.A. [1994]: Non-lectin component in a fermented extract from *Viscum album* L. grown on pines induces proliferation of lymphocytes from healthy and allergic individuals in vitro. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **47**, 33-38. 35

Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M. und Lappi, D.A. [1992]: Ribosome-inactivating proteins from plants: Present status and future prospects. *Bio/Technology* **10**, 405-412. 40

Studier, F.W. und Moffart, B.A. [1986]: Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130. 45

Vitetta, E. S., Thorpe, P. E., Uhr, J. W. (1993) 50  
Immunotoxins: magic bullets or misguided missiles? *Immunol. Today*, **14**, 252-259

Weston, S.A., Tucker, A.D., Thatcher, D.R., Derbyshire, D.J. und Paupit, R.A. [1994]: X-ray structure of recombinant Ricin A-Chain at 1.8 Å 55  
resolution. *J. Mol. Biol.* **244**, 410-422.

## Patentansprüche

1. Transgene Pflanze, die mit mindestens einem Vektor transformiert ist, der ein Nukleinsäuremolekül enthält, das

(a) ein Präproprotein codiert, das nach Reifung die biologische Funktion des Mistellektindimers aufweist und die in Fig. 4c dargestellte Nukleotidsequenz aufweist;

(b) ein Fragment des Präproproteins gemäß (a) codiert, wobei das Fragment natürlicherweise ein biologisch aktiver Bestandteil des Mistellektindimers ist;

(c) sich durch die Degeneration des genetischen Codes vom Nukleinsäuremolekül gemäß (a) oder (b) unterscheidet; oder

(d) unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekül gemäß (a), (b) oder (c) hybridisiert und ein Polypeptid mit der in (a) oder (b) angegebenen biologischen Funktion codiert.

2. Transgene Pflanze nach Anspruch 1, wobei das Fragment die A-Kette des Mistellektins ist, die durch die in Fig. 4a dargestellte Nukleotidsequenz codiert wird. 25

3. Transgene Pflanze nach Anspruch 1, wobei das Fragment die B-Kette des Mistellektins ist, die durch die in Fig. 4b dargestellte Nukleotidsequenz codiert wird. 30

4. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Nukleinsäuremolekül ein DNA-Molekül ist. 35

5. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Nukleinsäuremolekül ein RNA-Molekül ist. 40

6. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Vektor sowohl ein Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2 oder 4, sowie auch ein Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 3 oder 4 enthält. 45

7. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Vektor ein Expressionsvektor ist.

8. Polypeptid, das vom Wirt nach einem der Ansprüche 1 bis 7 produziert wird, und das

(a) mindestens eine enzymatische Modifizierung aufweist, wobei die enzymatische Modifizierung keine in *Viscum album* vorkommende Glykosylierung ist und/oder

(b) das ein Fusionsprotein ist.

9. Polypeptiddimer mit der biologischen Funktion des Mistellektins, wobei mindestens eines der Monomere ein Polypeptid nach Anspruch 8 ist.
10. Verfahren zur Herstellung des Polypeptids nach Anspruch 8 oder des Polypeptiddimers nach Anspruch 9, wobei man die transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 7 unter geeigneten Bedingungen züchtet und das so erhaltene Polypeptid oder Polypeptiddimer isoliert.
11. Immuntoxin, umfassend mindestens ein Polypeptid nach Anspruch 8 oder ein Polypeptiddimer nach Anspruch 9.
12. Arzneimittel, enthaltend das Polypeptid nach Anspruch 8 und/oder das Polypeptiddimer nach Anspruch 9 und/oder das Immuntoxin nach Anspruch 11, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.
13. Diagnostische Zusammensetzung mindestens enthaltend das Polypeptid nach Anspruch 8 und/oder das Polypeptiddimer nach Anspruch 9.

5

10

15

20

25

30

35

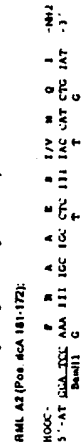
40

45

50

55

FIG. 1



PCR-Amplifikation von ML-Genfragmenten  
aus komplexer genomischer DNA aus *Viscum album*

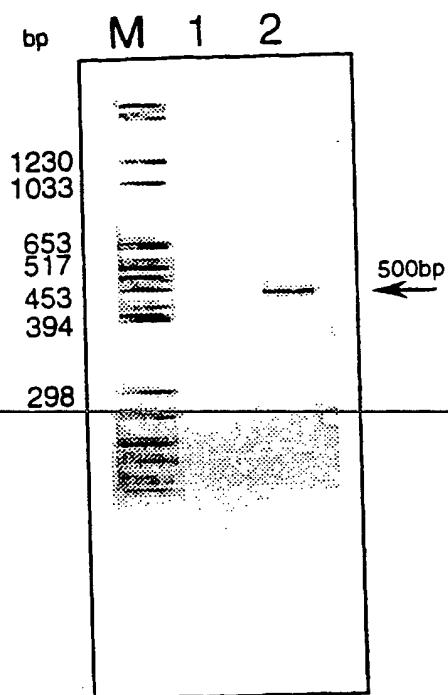


FIG. 2

## Klonierstrategie für rML

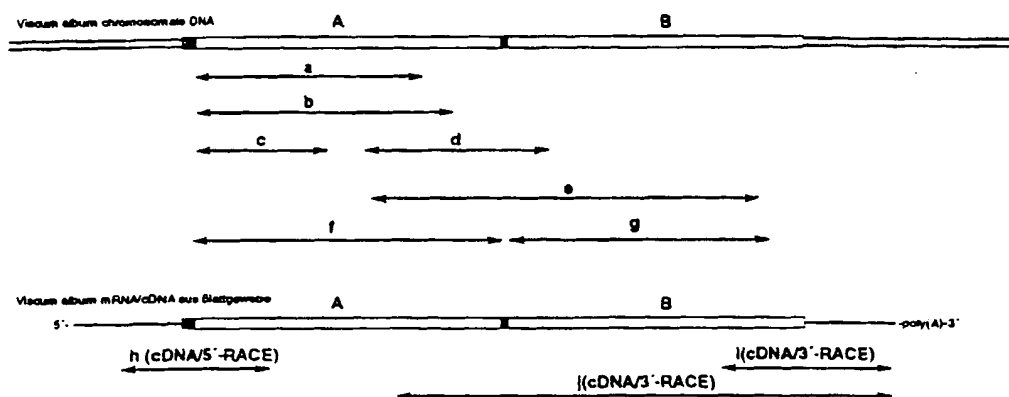


FIG. 3

# Rekombinante Insertionen der Expressionsvektoren pT7MLA und pT7MLB

## a. MLA

1/1  
CAT AAG TAC GAA COT ATT COT COT COT COT ACC CAC CAG ACC ACC COT GAA GAA TAT TTC  
NdeI NotI tyr glu arg ile arg leu arg val thr his gln thr thr gly glu glu tyr phe  
61/21  
CGG TTC ATC ACG CTT CTC CGA GAT TAT CTC TCA AGC GGA AGC TTT TCC AAT GAG ATA CCA  
arg phe ile thr leu leu arg asp tyr val ser ser gly ser phe ser asp glu ile pro  
121/41  
CTC TTG COT CAG TCT ACC ATC CCC CTC TCC CAT CCG CAA AGA TTT CTC TTG CTC GAG CTC  
leu leu arg gln ser thr ile pro val ser asp ala gln arg phe val leu val glu leu  
181/61  
ACC AAC CAG GGG GGA GAC TCG ATC ACG GCG GCG ATC CAC GTT ACT AAT CTG TAC CTC CTC  
thr asp gln gly gly asp ser ile thr ala ala ile asp val thr asp leu tyr val val  
241/81  
GCT TAC CAA CCA GCG GAC CAA TCC TAC TTT TTG CCG GAC CCA CCA CCG GCG GCG GAA AGC  
ala tyr gln ala gly asp gln ser tyr phe leu arg asp ala pro arg gly ala glu thr  
301/101  
CAT CTC TTC ACC CCG ACC ACC CGA TCC TCT CTC CCA TTC AAC GGA AGC TAC CTT CAT CTC  
his leu phe thr gly thr thr arg ser ser leu pro phe asp gly ser tyr pro asp leu  
361/121  
GAG CGA TAC CCG GGA CAT AGC GAC CAG ATC CTT CTC GGT ATA GAC CAA CTC ATT CAA TCC  
glu arg tyr ala gly his arg asp gln ile pro leu gly ile asp gln leu ile gln ser  
421/141  
GTC ACG GCG CTT COT TTT CTC GCG GCG AGC ACG COT ACC CAA COT COT TCG ATT TTA ATC  
val thr ala leu arg phe pro gly gly ser thr arg thr gln ala arg ser ile leu ile  
481/161  
CTC ATT CAG ATC ATC TCC GAG GCG GCG AGA TTC AAT CCC ATC TTA TGG AGG GCG CCG CAA  
leu ile gln met ile ser glu ala ala arg phe asp pro ile leu trp arg ala arg gln  
541/181  
TAC ATT AAC ACT GCG CCG TCA TTT CTC CCA GAC CTC TAC ATG CTC GAG CTC GAG ACG AGT  
tyr ile asp ser gly ala ser phe leu pro asp val tyr met leu glu leu glu thr ser  
601/201  
TGG GCG CAA CAA TCC ACG CAA CTC CAG CAT TCA ACC GAT GCG GTT TTT AAT AAC CCA ATT  
trp gly gln gln ser thr gln val gln his ser thr asp gly val phe asp asp pro ile  
661/221  
CGG TTG GCT ATA CCC CCG GGT AAC TTC GTG ACG TTG ACC AAT GTT CCG CAC GTG ATC GCG  
arg leu ala ile pro pro gly asp phe val thr leu thr asp val arg asp val ile ala  
721/241  
AGC TTG GCG ATC ATG TTG TTT GTA TGC GGA GAG CCG CCA TCT TAA TAG GGA TCC  
ser leu ala ile met leu phe val cys gly glu arg pro ser stop stop BamHI

## b. MLB

1/1  
CAT ATG GAT GAT GTT ACC TGC AGT GGT TCG GAA CTT ACC CTC CGG ATT CTC GGT CCA AAT  
NotI NotI asp asp val asp asp asp asp asp asp asp thr val arg ile val gly arg asp  
61/21  
GCG ATG TGC CTC GAC CTC CGA GAT GAC GAT TTC CCG GAT CCA AAT CAG ATA CAG TTC TCG  
gly met cys val asp val arg asp asp asp phe arg asp gly asp gln ile gln leu trp  
121/41  
CCC TCC AAG TCC AAC AAT GAT CCG AAT CAG TTG TGG ACG ATC AAA AGG GAT GGA ACC ATT  
pro ser lys ser asp asp pro asp gln leu trp thr ile lys arg asp gly thr ile  
181/61  
CGA TCC AAT GCG ACC TGC TTG ACC ACG TAT GCG TAT ACT GGT GCG CTC TAT GTC ATC ATC  
arg ser asp gly ser cys leu thr thr tyr gly tyr thr ala gly val tyr val met ile  
241/81  
TTC GAC TGT AAT ACT GGT CTC CCG GAG GCG ACT CTT TCG CAG ATA TGG GCG AAT GCG ACC  
phe asp cys asp thr ala val arg glu ala thr leu trp gln ile trp gly asp gly thr  
301/101  
ATC ATC AAT CCA AGA TCC AAT CTC GGT TTG GCA CCA TCA TCT GGA ATC AAA GCG ACT ACG  
ile ile asp pro arg ser asp leu val leu ala ala ser ser gly ile lys gly thr thr  
361/121  
CTT ACG CTC CAA ACA CTC GAT TAC ACG TTG GGA CAG GCG TCG CTT GCG GGT AAT GAT ACC  
leu thr val gln thr leu asp tyr thr leu gly gln gly trp leu ala gly asp asp thr  
421/141  
GCG CCA CCG GAG CTC ACC ATA TAT GCG TTC AGC GAC CTT TCG ATC CAA TCA AAT CCA GCG  
ala pro arg glu val thr ile tyr gly phe arg asp leu cys met glu ser asp gly gly  
481/161  
AGT GTC TGG CTC GAG ACG TCC GTG AGT ACG CAA AAG AAC CAA AGA TGG GGT TTG TAC GCG  
ser val trp val glu thr cys val ser ser gln lys asp gln arg trp ala leu tyr gly  
541/181  
GAT GGT TCT ATA CCG CCG AAA CAA AAC CAA GAC CAA TCC CTC ACC TGT GCG AGA GAC TCC  
asp gly ser ile arg pro lys gln asp gln asp gln cys leu thr cys gly arg asp ser  
601/201  
GTT TCA ACA GTA ATC AAT ATA GTT ACG TGC ACG GGT CCA TCG TCT GCG CAG CCA TGG CTC  
val ser thr val ile asp ile val ser cys ser ala gly ser ser gly gln arg trp val  
661/221  
TTT ACC AAT GAA GCG GCG ATT TTG AAT TTA AAG AAT GCG TTG GCG ATC GAT GCG CAA  
phe thr asp glu gly ala ile leu asp leu lys asp gly leu ala met asp val ala gln  
721/241  
GCA AAT CCA AAG CTC CCG CCA ATA ATC ATC TAT CTT CCG ACA GGA AAA CCA AAT CAA ATC  
ala asp pro lys leu arg arg ile ile ile tyr pro ala thr gly lys pro asp gln met  
781/261  
TGG CTT CCG CTC CCA TGA TAA GGA TCC  
trp leu pro val pro stop stop BamHI

FIG. 4

## Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von Präpromistellektin.

```

1/      31/
TTT TAT CTC CTG CCA TCT TCC ATC GGG GAG TCG CCG TGA CAC CAT TCA GGA ACA ATG AAT
Met Asn

61/3      91/13
GCG GTT ATG GAC TCA AGA AGG GCA TGG GCT TCG TGT TTT TTA ATG CTG GGC CTA GTT TTT
Ala Val Met Asp Ser Arg Arg Ala Trp Ala Ser Cys Phe Leu Met Leu Gly Leu Val Phe

121/23      131/33
GCT GCG ACG GTC AAA GCG GAA ACC AAA TTC AGC TAC GAG AAG CTA AGA CTC AGA GTT ACG
Gly Ala Thr Val Lys Ala Glu Thr Lys Phe Ser Tyr Glu Arg Leu Arg Leu Arg Val Thr

181/43      211/53
CAT CAA ACC ACG GGC GAC GAA TAT TTC CCG TTC ATC ACG CTT CTC CGA GAT TAT GTC TCA
His Gln Thr Thr Gly Asp Glu Tyr Phe Arg Phe Ile Thr Leu Leu Arg Asp Tyr Val Ser

241/63      271/73
AGC GGA AGC TTT TCC AAT GAG ATA CCA CTC TTG COT CAG TCT ACG ATC CCC GTC TCC GAT
Ser Gly Ser Phe Ser Asn Glu Ile Pro Leu Leu Arg Gln Ser Thr Ile Pro Val Ser Asp

301/83      331/93
GCG CAA AGA TTT GTC TTO GTG GAG CTC ACC AAC CAG GGG GGA GAC TCG ATC ACG GGC GGC
Ala Gln Arg Phe Val Leu Val Glu Leu Thr Asn Gln Gly Gly Asp Ser Ile Thr Ala Ala

361/103      391/113
ATC GAC GTT ACC AAT CTG TAC GTC GTG GCT TAC CAA Ala GGC GAC CAA TCC TAC TTT TTG
Ile Asp Val Thr Asn Leu Tyr Val Val Ala Tyr Gln Ala Gly Asp Gln Ser Tyr Phe Leu

421/123      451/133
CGC GAC GCA CCA CGC GGC GCG GAA ACG CAT CTC TTC ACC GGC ACC ACC CGA TCC TCT CTC
Arg Asp Ala Pro Arg Gly Ala Gln Thr His Leu Phe Thr Gly Thr Thr Arg Ser Ser Leu

481/143      511/153
CCA TTC AAC GGA AGC TAC CCT GAT CTG GAG CGA TAC GGC GGA CAT AAG GAC CAG ATC CCT
Pro Phe Asn Gly Ser Tyr Pro Asp Leu Glu Arg Tyr Ala Gly His Arg Asp Gln Ile Pro

541/163      571/173
CTC GGT ATA GAC CAA CTC ATT CAA TCC GTC ACG GCG CTT COT TTT CCG GGC GGC AGC ACG
Leu Gly Ile Asp Gln Leu Ile Gln Ser Val Thr Ala Leu Arg Phe Pro Gly Gly Asn Thr

601/183      631/193
AAT CCC ATC TTA TGG AAG GCT CGC CAA TAC ATT AAC AGT GGG GCG TCA TTT CTG CCA GAC
Asn Pro Ile Leu Trp Arg Ala Arg Gln Tyr Ile Asn Ser Gly Ala Ser Phe Leu Pro Asp

661/203      691/213
GTC GGT ATA GAC CAA CTC ATT CAA TCC GTC ACG GCG CTT COT TTT CCG GGC GGC AGC ACG
Leu Gly Ile Asp Gln Leu Ile Gln Ser Val Thr Ala Leu Arg Phe Pro Gly Gly Asn Thr

721/223      751/233
GTC GGT ATA GAC CAA CTC ATT CAA TCC GTC ACG GCG CTT COT TTT CCG GGC GGC AGC ACG
Leu Gly Ile Asp Gln Leu Ile Gln Ser Val Thr Ala Leu Arg Phe Pro Gly Gly Asn Thr

781/243      811/253
ACC GAT GGC GTT TTT AAT AAC CCA ATT CGG TTT GCT ATA CCC CCC GGT AAC TTC GTG ACG
Thr Asp Gly Val Phe Asn Asn Pro Ile Arg Leu Ala Ile Pro Pro Gly Asn Phe Val Thr

841/263      871/273
TTC ACC AAT GTT CGC GAC GTG ATC GGC AGC TTG GCG ATC ATG TTG TTT GTA TCC GGA GAG
Leu Thr Asn Val Arg Asp Val Ile Ala Ser Leu Ala Ile Met Leu Phe Val Cys Gly Glu

901/283      931/293
CGG CCA TCT TCC TCT GAG GTG CGC TAT TGG CCG CTG GTC ATA CGA CCC GTG ATA GGC GAT
Arg Pro Ser Ser Ser Glu Val Arg Tyr Trp Pro Leu Val Ile Arg Pro Val Ile Ala Asp

961/303      991/313
GAT GTT ACC TGC AGT GCT TCG GAA CCT ACG GTG CCG ATT GTG GGT CGA AAT GGC ATG TCC
Asp Val Thr Cys Ser Ala Ser Glu Pro Thr Val Arg Ile Val Gly Arg Asn Gly Met Cys

1021/323      1051/333
GTC GAC GTC CGA GAT GAC GAT TTC CGC GAT GGA AAT CAG ATA CAG TTG TGG CCC TCC AAG
Val Asp Val Arg Asp Asp Asp Phe Arg Asp Gly Asn Gln Ile Gln Leu Trp Pro Ser Lys

1081/343      1111/353
TCC AAC AAT GAT CCG AAT CAG TTG TGG ACG ATC AAA AAG GAT GGA ACC ATT CGA TCC AAT
Ser Asn Asn Asp Pro Asn Gln Leu Trp Thr Ile Lys Arg Asp Gly Thr Ile Arg Ser Asn

1141/363      1171/373
GCG AGC TGC TTG ACC ACG TAT GGC TAT ACT GCT GGC GTC TAT GTG ATC ATC TTC GAC TGT
Gly Ser Cys Leu Thr Thr Tyr Gly Tyr Thr Ala Gly Val Tyr Val Met Ile Phe Asp Cys

1201/383      1231/393
AAT ACT GCT GTG CCG GAG GCC ACT CTT TGG CAG ATA TGG GGC AAT GGG ACC ATC ATC AAT
Asn Thr Ala Val Arg Gln Ala Thr Leu Trp Gln Ile Trp Gly Asn Gly Thr Ile Ile Asn

1261/403      1291/413
CCA AGA TCC AAT CTG GTT TTG GCA GCA TCA TCT GGA ATC AAA GGC ACT ACG CTT ACG GTG
Pro Arg Ser Asn Leu Val Leu Ala Ala Ser Ser Gly Ile Lys Gly Thr Thr Leu Thr Val

1321/423      1351/433
CAA ACA CTG GAT TAC ACG TTG GGA CAG GGC TGG CTT GCT GGT AAT GAT ACC GCC CCA CGC
Gln Thr Leu Asp Tyr Thr Leu Gly Gln Gly Trp Leu Ala Gly Asn Asp Thr Ala Pro Arg

1381/443      1411/453
GAG GTG ACC ATA TAT GGG TTC AAG GAC CTT TGC ATG GAA TCA AAT GGA GGG AGT GTG TGG
Gln Val Thr Ile Tyr Gly Phe Arg Asp Leu Cys Met Gln Ser Asn Gly Gly Ser Val Trp

1441/463      1471/473
GTG GAG ACG TGC GTG AGT AGC CAA AAG AAC CAA AGA TGG GCT TTG TAC GGG GAT GGT TCT
Val Gln Thr Cys Val Ser Ser Gln Lys Asn Gln Arg Trp Ala Leu Tyr Gly Asp Gly Ser

1501/483      1531/493
ATA CGC CCC AAA CAA AAC CAA GAC CAA TCC CTC ACC TGT GGG AGA GAC TCC GTT TCA ACA
Ile Arg Pro Lys Gln Asn Gln Asp Gln Cys Leu Thr Cys Gly Arg Asp Ser Val Ser Thr

1561/503      1591/513
GGA ATC AAT ATA GTT AGC TGC AGC GCT GGA TCG TCT GGG CAG CGA TGG GTG TTT ACC AAT
Val Ile Asn Ile Val Ser Cys Ser Ala Gly Ser Ser Gly Gln Arg Trp Val Phe Thr Asn

1621/523      1651/533
GAA GGG GCC ATT TTG AAT TTA AAG AAT GGG TGG GCT ATG GAT GTG GCG CAA GCA AAT CCA
Gln Gly Ala Ile Leu Asn Leu Lys Asn Gly Leu Ala Met Asp Val Ala Gln Ala Asn Pro

1681/543      1711/553
AAG CTC CGC CGA ATA ATC ATC TAT CTT GGC ACA GGA AAA CCA AAT CAA ATG TGG CTT CCC
Lys Leu Arg Arg Ile Ile Ile Tyr Pro Ala Thr Gly Lys Pro Asn Gln Met Trp Leu Pro

1741/563      1771/573
GTG CCA TGA TTT AAG TTC ATG GCT CGA AGA TTG CTT GCA TGC GAC CAT CCT TTC TAT TTT
Val Pro Stop

1801/      1831/
CTC TTT TCT ACC TTT TGA AAT AAT GTC TOT GAA TAA TOT GGC ACG TTG AAG CCC GGC GAA
1861/
AGA AGC CTT AGC CAC CTT GTG TTT GAG AAT AAA TGA GTT AAT GCA AGC AAT CAA CTT CTC
1891/
CTT

```

Die Sequenz ist abgeleitet von den klonierten ML-Genfragmenten "h" (Nucleotide 1 - 204), "f" (Nucleotide 205 - 909), "e" (Nucleotide 910 - 957), "g" (Nucleotide 958 - 1746) und "i" (Nucleotide 1747 - 1923)

FIG. 4c



## Konstruktion des MLA-Expressionsvektors pT7-MLA

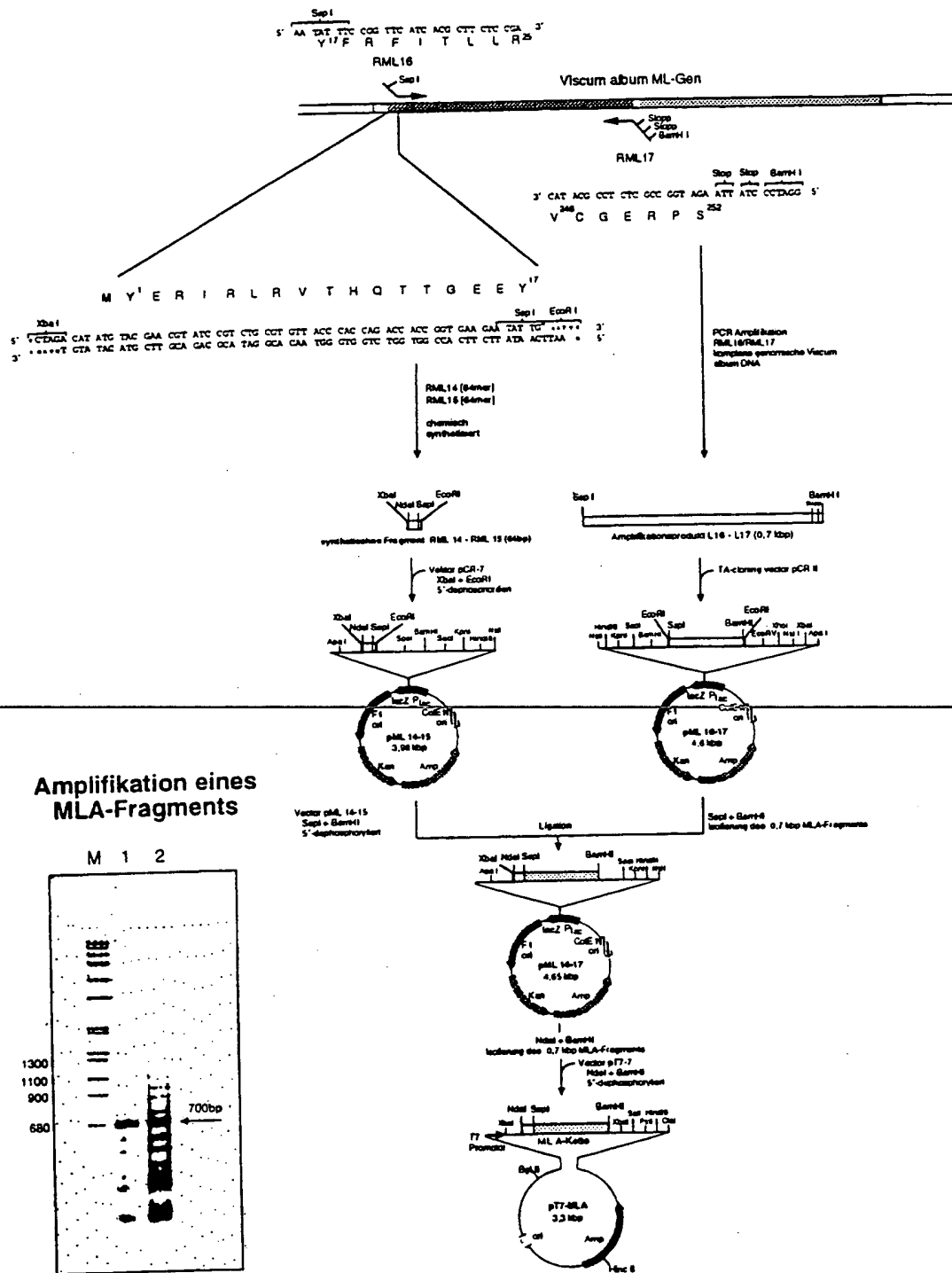


FIG. 5

## Konstruktion des ML-B Expressionsvektors pT7-MLB

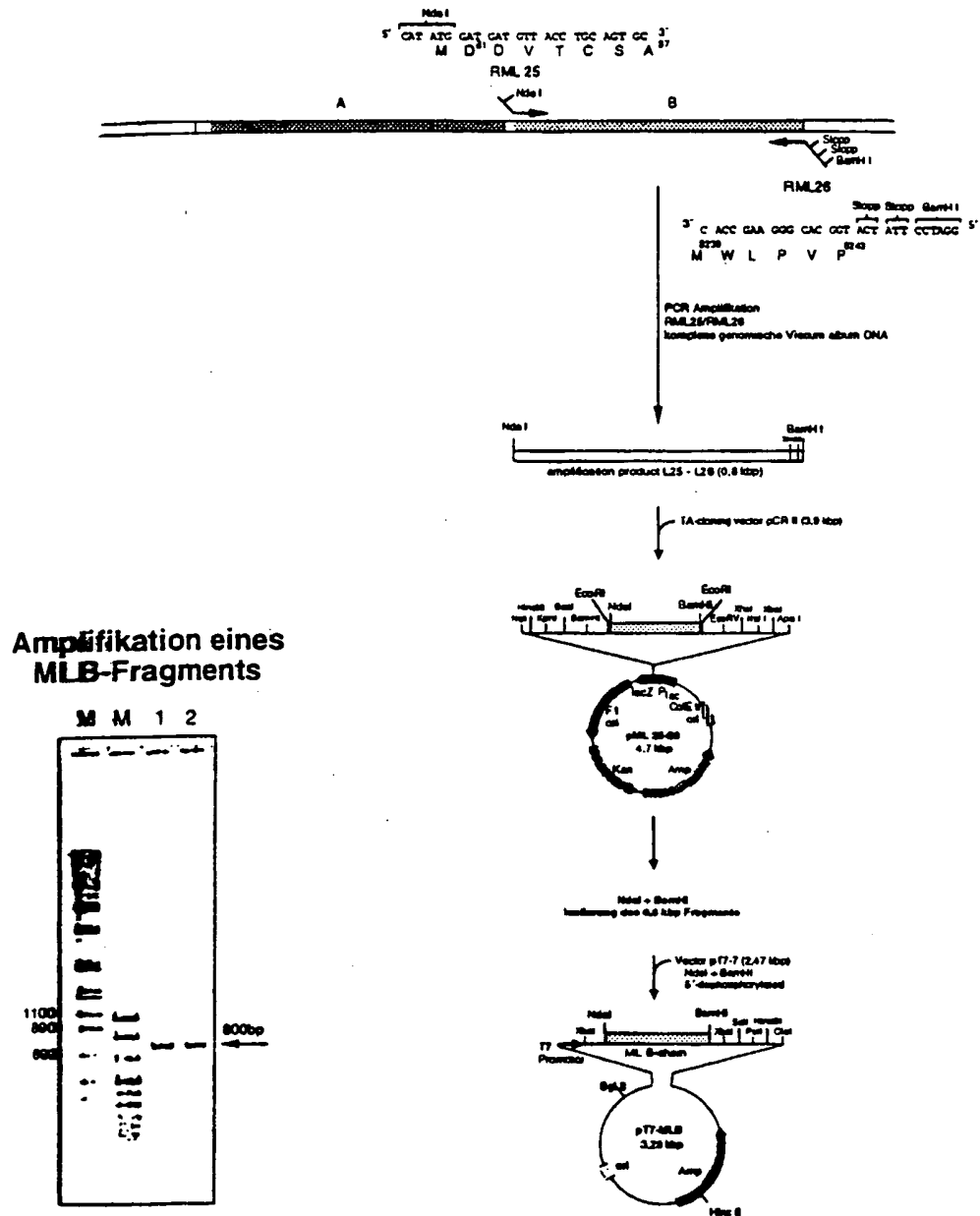
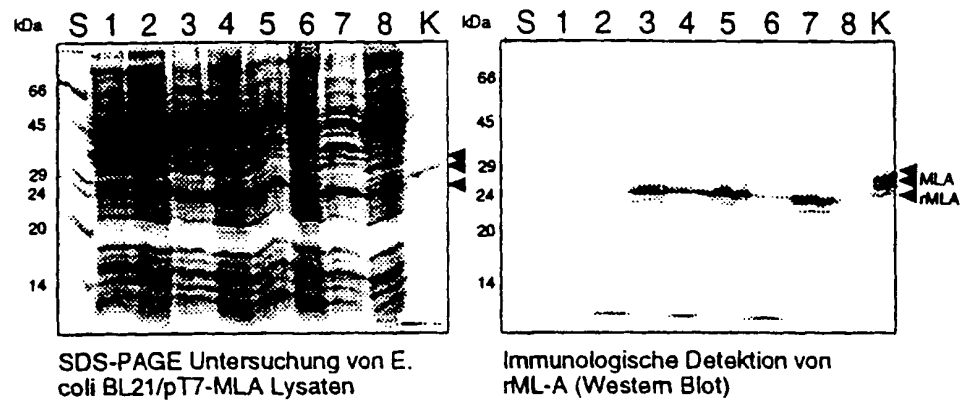


FIG. 6

# Expression von rMLA und rMLB

## a.: Expression der rMLA-Kette



## b.: Expression der rMLB-Kette

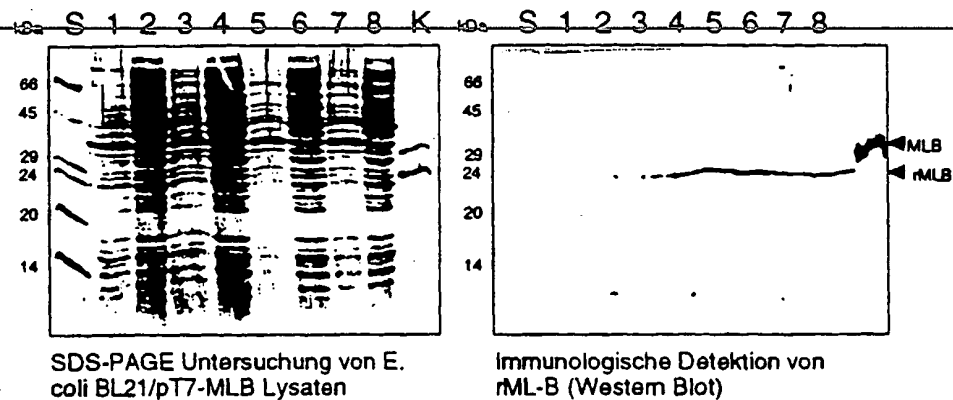


FIG. 7

Isoelektrische Chromatofokussierung von rMLA  
and rMLB vs. MLA, MLB und ML-1 Holoprotein

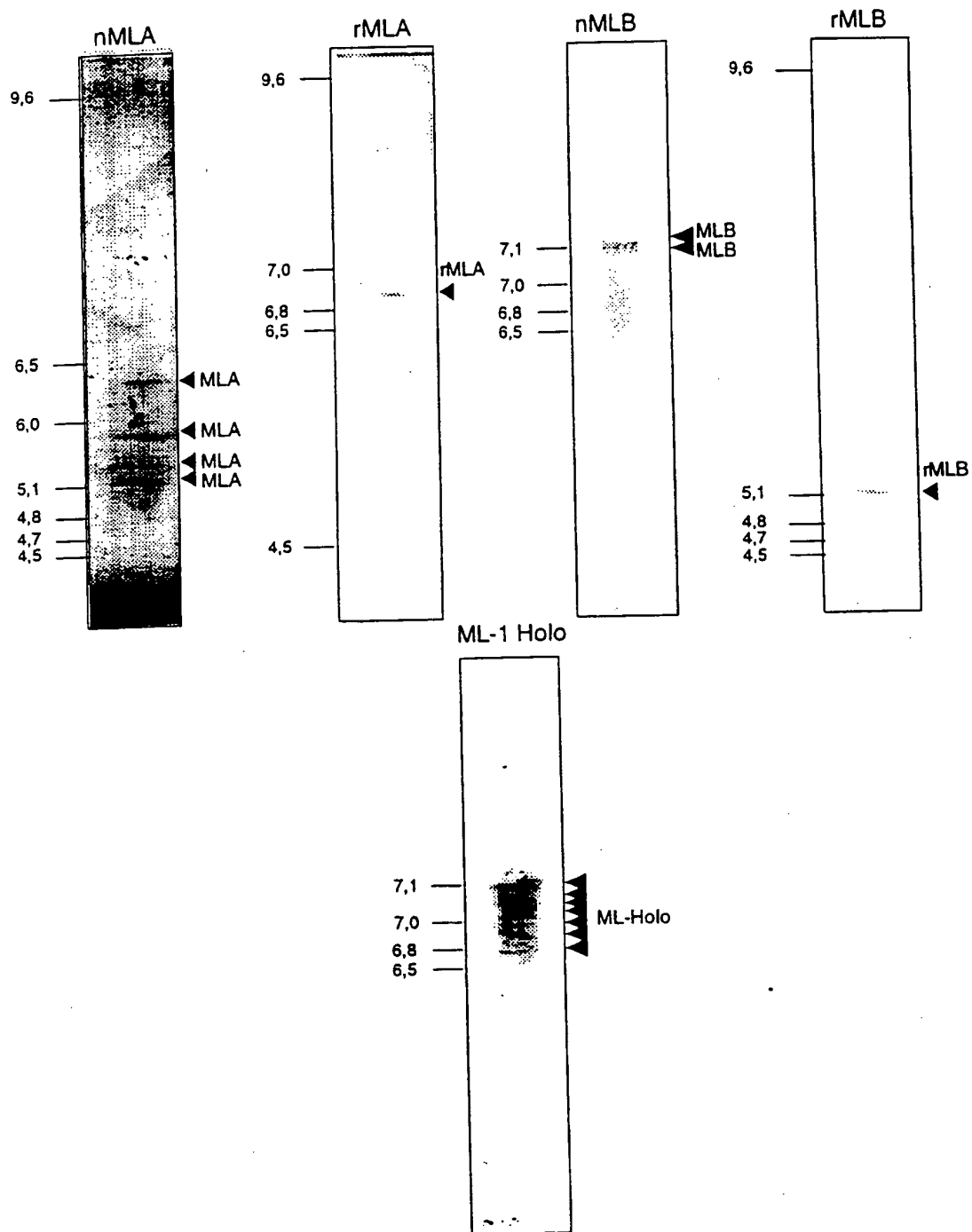


FIG. 8

## Enzymatische Aktivität von rMLA

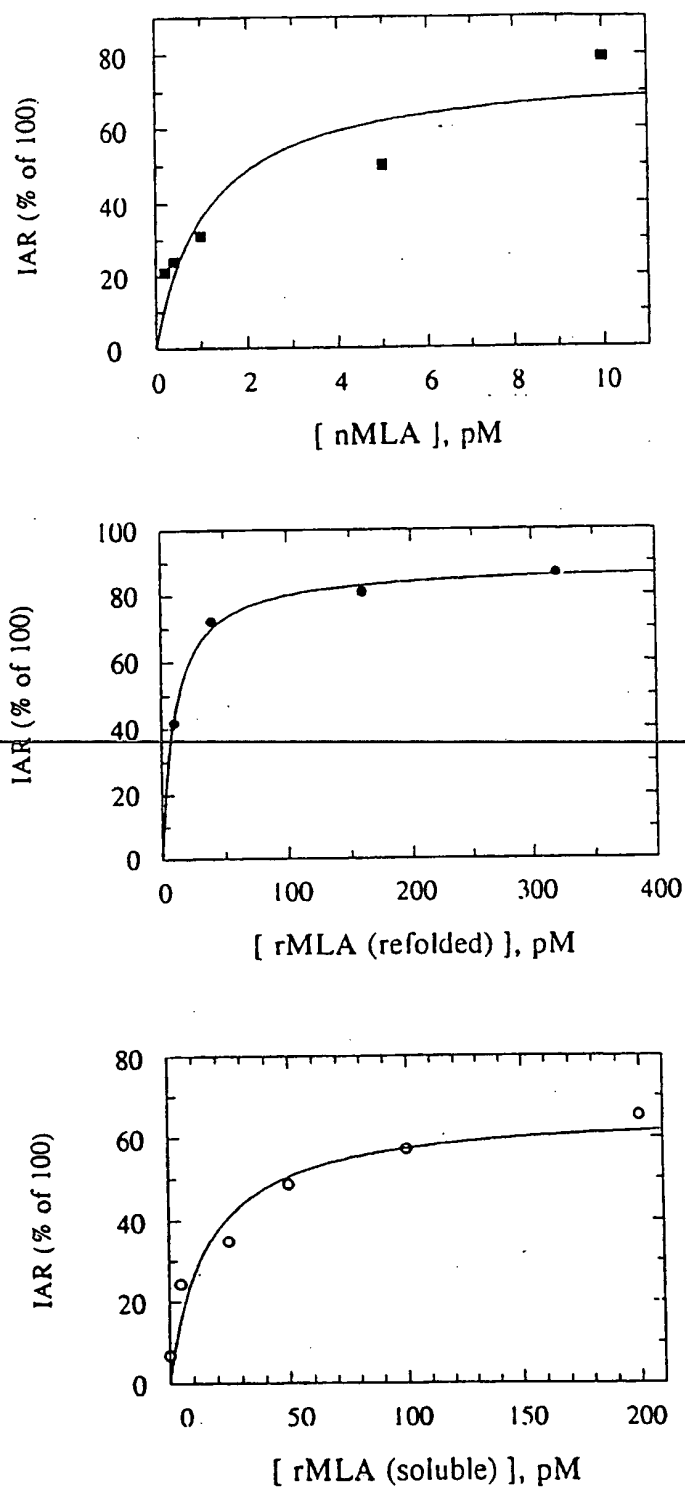


FIG. 9

## Carbohydrat-Bindecharakteristik von rMLB

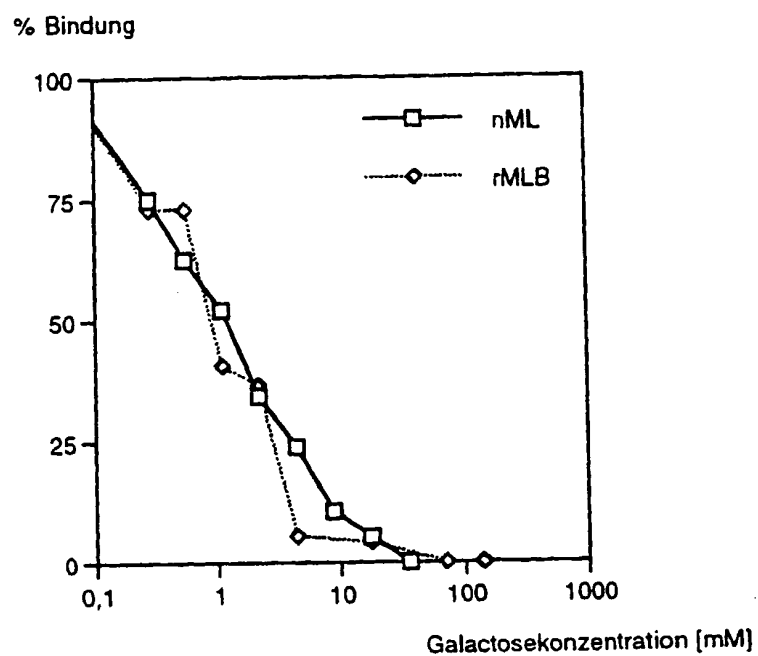


FIG. 10

## MOLT4 Cytotoxizität von rML

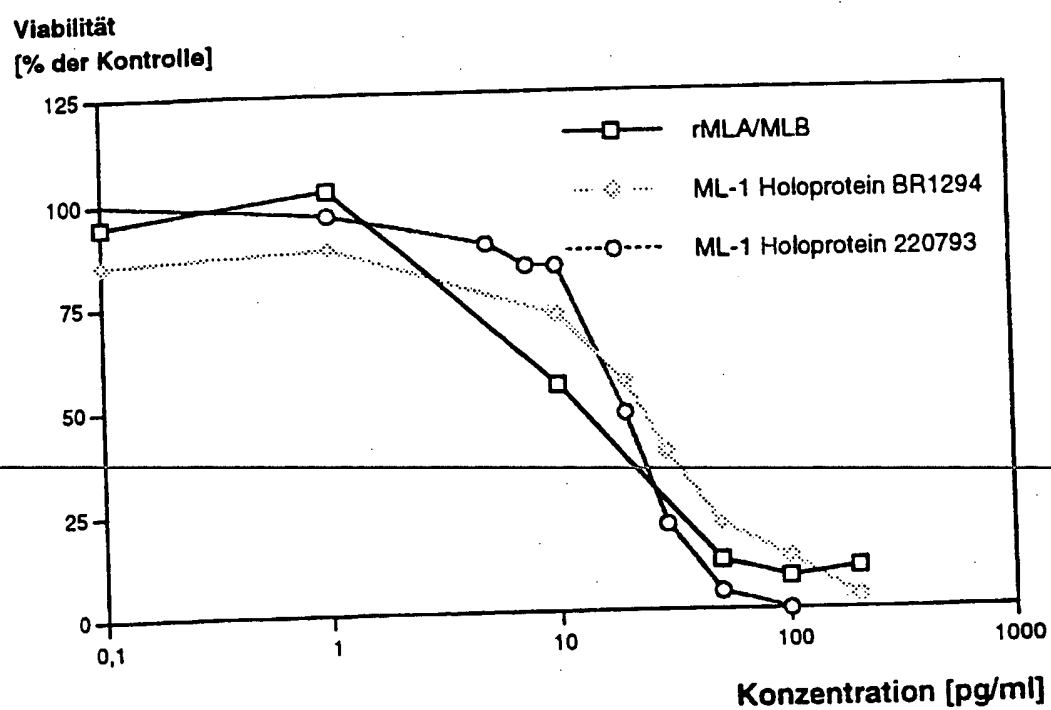


FIG. 11



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 98 10 5660

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
D,X	DE 42 21 836 A (GABIUS, HANS JOACHIM, GERMANY; BARDOSI, ATTILA) 5. Januar 1994	8,9, 11-13	C12N15/29 C07K14/42
Y	* das ganze Dokument *	1-8,10	C12N15/62 A61K38/16
Y	US 5 276 269 A (RAIKHEL NATASHA V) 4. Januar 1994	1-8,10	A61K35/78 A61K47/48 C07K19/00 C12Q1/68
	* das ganze Dokument *		//A61K45/05
D,A	GABIUS, H.-M. ET AL.: "The immunomodulatory beta-galactosidase-specific lectin from mistletoe: partial sequence analysis, cell and tissue binding, and impact on intracellular biosignalling of monocytic leukemia cells" ANTICANCER RESEARCH 12 (3). 1992. 669-676, XP002019005	8,9	
	* das ganze Dokument *		
A	CHRISPEELS, M. & RAIKHEL, N.: "Lectins, lectin genes, and their role in plant defense" PLANT CELL, Bd. 3, 1991, MD US, Seiten 1-9, XP002019004	1-7,10	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
	* das ganze Dokument *		C07K C12N C12Q A61K
A	PAPROCKA, M. ET AL.: "THE ACTIVITY OF TWO IMMUNOTOXINS COMPOSED OF MONOCLONAL ANTIBODY MOAB-16 AND A-CHAIN OF RICIN MOAB-16-RTA OR A-CHAIN OF MISTLETOE LECTIN I MOAB-16-MLIA." ARCH IMMUNOL THER EXP 40 (3-4). 1992. 223-227, XP002019006	11	
	* das ganze Dokument *		
-/-			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort <b>DEN HAAG</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>25. Juni 1998</b>	
		Prüfer <b>Andres, S</b>	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

EPO FORM 1503 03 82 (P04C03)





Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 98 10 5660

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
A	DE 43 41 476 A (PFUELLER UWE DR) 8. Juni 1995 * das ganze Dokument * -----	8,12,13	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 25. Juni 1998	
		Prüfer Andres, S	
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet  Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie  A : technologischer Hintergrund  O : mündliche Offenbarung  P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze  E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  D : in der Anmeldung angeführtes Dokument  L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument  &amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EPO FORM 1503 03.82 (P04C03)

The first part of the paper discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It is essential for the business to have a clear and concise record of all income and expenses. This will allow the business to track its financial performance over time and identify areas where it may be able to reduce costs or increase revenue.

The second part of the paper discusses the importance of maintaining accurate records of all assets and liabilities. This will allow the business to track its net worth over time and identify areas where it may be able to increase its assets or reduce its liabilities.

The third part of the paper discusses the importance of maintaining accurate records of all taxes paid. This will allow the business to track its tax liability over time and identify areas where it may be able to reduce its tax liability.

The fourth part of the paper discusses the importance of maintaining accurate records of all contracts and agreements. This will allow the business to track its legal obligations over time and identify areas where it may be able to reduce its legal liability.

The fifth part of the paper discusses the importance of maintaining accurate records of all personnel records. This will allow the business to track its human resources over time and identify areas where it may be able to improve its personnel management.

The sixth part of the paper discusses the importance of maintaining accurate records of all customer records. This will allow the business to track its customer base over time and identify areas where it may be able to improve its customer service.

The seventh part of the paper discusses the importance of maintaining accurate records of all inventory records. This will allow the business to track its inventory over time and identify areas where it may be able to reduce its inventory costs.

The eighth part of the paper discusses the importance of maintaining accurate records of all equipment records. This will allow the business to track its equipment over time and identify areas where it may be able to reduce its equipment costs.

The ninth part of the paper discusses the importance of maintaining accurate records of all insurance records. This will allow the business to track its insurance coverage over time and identify areas where it may be able to reduce its insurance costs.

The tenth part of the paper discusses the importance of maintaining accurate records of all legal records. This will allow the business to track its legal obligations over time and identify areas where it may be able to reduce its legal liability.